

Charakterisierung der funktionellen Domänen von mDia1, einem Verbindungsprotein an der Schnittstelle zwischen der kleinen GTPase Rho und dem Aktin-Cytoskelett

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

DISSERTATION

von Anja Krebs
aus Düren/Lendersdorf

1. Referentin oder Referent: Frau Prof. Dr. B.M.Jockusch
2. Referent oder Referentin: Herr Prof. Dr. J. Wehland
eingereicht am: 17.04.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.07.2000
2000

(Druckjahr)

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Anja Krebs, Martin Rothkegel, Naoki Watanabe, Shuh Narumiya and Brigitte M. Jockusch (1998) Characterization of the interaction between profilin and p140mDia. Eur. J. of Cell Biol. Supplement 48 (Vol.. 75): 61

Anja Krebs, Martin Rothkegel, Naoki Watanabe, Shuh Narumiya and Brigitte M. Jockusch (2000) mDia1, a molecular link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. 51. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VII
I. Einleitung	1
1. Das Cytoskelett	1
2. Profilin, ein Regulator des Mikrofilamentsystems	4
2.1. Bindungspartner des Profilins	5
3. Die Proteinfamilie der Formine	6
3.1. Das forminähnliche Protein mDia1	8
4. Die Rho Familie der kleinen GTPasen	10
5. Aufgabenstellung	13
II. Material und Methoden	14
1. Material	14
1.1. Chemikalien und Enzyme	14
1.2. Bakterienstämme	14
1.3. Hefestämme	14
1.4. Zellen	15
1.5. Vektoren	15
1.6. Oligodesoxynukleotide	16
1.7. Medien und Lösungen	17
1.8. Antikörper	19
1.9. Geräte	21
2. Methoden	22
2.1. Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1. Anzucht von <i>E.coli</i>	22
2.1.2. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> für die Transformation	22
2.1.3. Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	22

2.1.4.	Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.1.5.	DNA-Konzentrationsbestimmung	24
2.1.6.	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	24
2.1.7.	Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-DNA-Enden	24
2.1.8.	<i>In vitro</i> -Neukombination von DNA-Fragmenten und Selektion rekombinanter Klone	25
2.1.9.	Agarosegelelektrophorese	25
2.1.10.	DNA-Fragmentisolierung	26
2.1.11.	DNA-Sequenzierung	27
2.1.12.	Interaktionstest zweier Proteine im „Yeast two-hybrid system”	28
2.1.13.	<i>In vitro</i> -Translation von Proteinen	30
2.2.	Biochemische Methoden	31
2.2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.2.	Immunblot von Proteinen	32
2.2.3.	Expression und Reinigung von rekombinanten Mausprofilin I und II	33
2.2.4.	Affinitätspräzipitation	34
2.2.5.	Coimmunpräzipitation	36
2.3.	Zellbiologische Methoden	37
2.3.1.	Kultivierung von Zellkulturzellen	37
2.3.2.	Fixieren von Zellkultur-Zellen	37
2.3.3.	Indirekte Immunfluoreszenz und Doppelfluoreszenz mit Phalloidin	38
2.3.4.	Mitochondrien-„Recruitment”	39
2.3.5.	Transiente und stabile Transfektion	39
2.3.6.	„Cell-Spreading” und „Wounding-Assay”	40
III.	Ergebnisse	41
1.	Identifizierung der Bindungsstelle von mDia1 und Profilin	41
1.1.	Herstellung verschiedener Deletionsmutanten zur Identifizierung Der Bindungsstelle für Profilin	41

1.2. Charakterisierung der Interaktion von mDia1 und Profilin im „Yeast two-hybrid system“	43
1.3. Mitochondrien Targeting von mDia1 und $\Delta 7$ mDia durch Maus-Profilin I	44
1.4. Affinitätspräzipitation von mDia1-Fragmenten mit Profilin-Sepharose	46
1.5. Immunpräzipitation aus Zellen von mDia1 und seinen Deletionsfragmenten nach in situ crosslinking	48
 2. Herstellung stabil exprimierender Zell-Linien von mDia1 und seines Deletionsfragmentes $\Delta 1$mDia	 50
2.1. Das stabil exprimierte $\Delta 1$ mDia-Protein verstärkt die Zellanheftung und die Zellausbreitung	52
2.2. Verminderung der lokomotorischen Aktivität durch die Rho-Bindungsdomäne	54
2.3. Überexpression der Rho-Bindungsdomäne von mDia1 Bewirkt extensives Ruffling in CHO-Zellen	55
2.4. Analyse der stabilen Transfektanten mittels Immunfluoreszenz	57
2.5. Inhibition des durch $\Delta 1$ mDia induzierten Rufflings durch dominant negatives Rac1	59
2.6. Das $\Delta 1$ mDia-Protein interagiert <i>in vivo</i> ausschließlich mit Nager mDia1	60
 IV. Diskussion	 63
1. Kartierung der Bindungsstelle von Profilin und mDia1	63
2. Herstellung stabil transfizierter CHO-Zellen und Charakterisierung der Proteine im Zellsystem	67
3. Charakterisierung der stabil exprimierenden Zellen im Hinblick auf ihre Motilität	68
4. Ausblick	74

V. Literaturverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	engl. Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Caboxy-Terminus
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CHO	„Chinese hamster ovary“
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSP	Dithio-bis(Succinimidylpropionat)
DTE	Dithioerythritol
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECL	engl. verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)N,N,N’,N’-Tetraessigsäure
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	engl. Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isithiocyanat
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Guanin
G-Aktin	globuläres Aktin
G-Proteine	kleine, GTP-bindende Proteine
h	engl. Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N’-[Ethanschwefelsäure]
HMW	„high molecular weight marker“
HRP	engl. Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
LiAc	Lithium-Acetat
LMW	„low molecular weight marker“
M, cm, mm, µm, nm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer

M, mM, μ M, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampere
min	engl., Minute
mol, mmol, μ mol, nmol	mol, Millimol, Mikromol, Nanomol
MW	engl., Molekulargewicht
MWCO	engl., molekulares Ausschluß-Volumen
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	engl., Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethanschwefelsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl., Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	engl., Natrium-Dodecylsulfat
s	engl., Sekunde
sog.	Sogenannt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
U	engl., Enzymeinheiten
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VASP	„Vasodilator stimulated phosphoprotein“
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl- β -D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

mDia1 ist ein Säuger-Homologes des Drosophila Proteins *Diaphanous* und gehört zur Familie der Formine. Diese Proteine liegen an der Schnittstelle zwischen den kleinen GTPasen und dem Aktin-Cytoskelett. Zahlreiche Vertreter dieser Proteinfamilie, inklusive mDia1 (Watanabe et al., 1997), beinhalten Rho- und Profilin-Bindungsdomänen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die funktionellen Domänen des mDia1-Proteins charakterisiert werden. Ziel war es, die Bindungsstelle des Profilins in Zellen zu kartieren, sowie die Funktion der Rho-Wechselwirkungsstelle näher zu untersuchen, da diese nach Expression in Zellen extensives Membranruffling verursacht. Desweiteren konnten Veränderungen der Zell-Lokomotion und eine Änderung des Verhaltens im Prozeß der Zellausbreitung beobachtet werden, wenn die Rho-Bindungsstelle in Zellen exprimiert wurde.

Durch die Benutzung unterschiedlicher Deletionsfragmente, *in vitro* Reaktionsansätzen und transient transfizierter HeLa-Zellen, konnte gezeigt werden, daß die Interaktion mit Profilin über die prolinreiche FH1-Domäne vermittelt wird, wie sie im $\Delta 7$ mDia-Fragment enthalten ist. Dieses Polypeptid formt ebenfalls Proteinkomplexe mit Profilin im System Zelle.

Stabil exprimierende CHO-Transfektanten, welche die Rho-Bindungsdomäne von mDia1 ($\Delta 1$ mDia) überexprimieren, weisen massive Membranaktivitäten, die phänotypisch Ruffles entsprechen, im Vergleich zu Zellen, welche das wt-Protein bzw. die Kontrolle EGFP exprimieren, auf. Zusätzlich weisen die mit $\Delta 1$ mDia transfizierten Zellen eine schnellere Zellausbreitung auf, waren jedoch bei gerichteter Lokomotion verlangsamt. Der Effekt des Rufflings benötigt desweiteren die homologe $\Delta 1$ mDia-Sequenz, in humanen Zell-Linien tritt dieser Effekt nicht auf, konnte aber durch die Verwendung dominant negativen Rac's unterdrückt werden.

Vermutlich kommt es zu einer Aktivierung des endogenen mDia1-Proteins durch die Expression von $\Delta 1$ mDia, indem dieses Fragment die intramolekulare Interaktion des wt-Proteins aufbricht. Ähnliches konnte bereits für GTP-Rho nachgewiesen werden (Watanabe et al., 1999). Durch die Aktivierung des endogenen mDia1 kommt es zu einer vermehrten Bindung zellulären Rho-GTP's an die Rho-Interaktionsstelle des Formins. Als Konsequenz wird ein Anstieg Rac-vermittelter Effekte beobachtet, da es durch die vermehrte Wechselwirkung von endogenem mDia1 und GTP-Rho zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho kommt.

I. Einleitung

1. Das Cytoskelett

Eukaryotische Zellen haben die Fähigkeit verschiedene Gestalt anzunehmen und koordinierte und zielgerichtete Bewegungen durchzuführen. Diese Fähigkeiten werden durch ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Proteinfilamentsysteme, dem Cytoskelett, vermittelt, welches sich durch das gesamte Cytoplasma erstreckt. Das Cytoskelett ist definiert als die Gesamtheit der im Cytoplasma verbleibenden, fädigen Zellstrukturen nach Extraktion mit einem nicht-ionischen Reagenz (Osborn und Weber, 1977). Das Cytoskelett ist keine starre, statische Struktur, sondern ein hochdynamisches und in ständigem Umbau begriffenes System. Es ist maßgeblich an so vielgestaltigen und komplexen Vorgängen wie Gestaltgebung, Zelldifferenzierung, Zellteilung, Zell-Lokomotion, Kontaktaufnahme zu Nachbarzellen und zum Substrat, Muskelkontraktion, intrazellulären Bewegungsvorgängen und vielem mehr, beteiligt.

Die unterschiedlichen Aufgaben des Cytoskeletts werden von drei verschiedenen Proteinfilamentsystemen übernommen:

- Mikrotubuli
- Intermediärfilamentsystem
- Mikrofilamentsystem

Die drei Filamentsysteme bestehen aus verschiedenen Proteingrundbausteinen. Mikrotubuli werden aus dem Grundbaustein Tubulin aufgebaut und stellen die primären Organisationszentren des Cytoskeletts dar. Intermediärfilamente bestehen aus Untereinheiten einer Familie fibröser Proteine, wie zum Beispiel Vimentin, Lamin oder Keratin und verleihen einer Zelle hauptsächlich mechanische Widerstandskraft. Aktin bildet das Monomer für den Aufbau von Mikrofilamenten, die besonders für die Bewegungsvorgänge der Zelle verantwortlich sind. Hinzu kommt eine große Zahl akzessorischer Proteine, die einen strukturellen oder regulierenden Einfluß auf die Filamente und ihre dreidimensionale Organisation ausüben. Mit Hilfe dieser akzessorischen Proteine erhalten besonders die Mikrotubuli und das Mikrofilamentsystem eine große Variabilität und Flexibilität, die es ihnen ermöglicht, die zahlreichen Funktionen des Cytoskeletts koordiniert und zielgerichtet zu erfüllen.

Aktin-Mikrofilamente sind lineare, filamentöse Polymere (**F-Aktin**), welche aus globulären Untereinheiten (**G-Aktin**) aufgebaut sind und in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Jedes Filament hat eine helikale Struktur und besitzt eine strukturelle Polarität mit einem schnell wachsenden (+) -Ende und einem langsam wachsenden (-) -Ende. Obwohl Aktin im gesamten Bereich des Cytoplasmas einer eukaryontischen Zelle zu finden ist, liegt es bei vielen Zellen unterhalb der Plasmamembran als sogenannter Zell-Cortex vor, der ein Netzwerk aus Aktin-Filamenten darstellt und die äußere Hülle der Zelle mechanisch unterstützt. Die Quervernetzung wird hierbei durch unterschiedliche Aktin-bindende Proteine vermittelt.

Bei den Bewegungen vieler tierischer Zellen werden Plasmamembranbereiche, die Bündel von Aktin-Filamenten enthalten, vorgestreckt und wieder zurückgezogen. Die **Lokomotion** kann grob in drei verschiedene Prozesse unterteilt werden. Zuerst kommt es zu Ausstülpungen der Plasmamembran am Vorderpol der Zelle, im Bereich der sogenannten **Führungslamelle**. Diese Ausstülpungen stellen anschließend neue **Zell-Matrix-Kontakte** her. Schließlich zieht die Zelle den restlichen Zellkörper in Bewegungsrichtung nach, indem sie im hinteren Zellbereich Zell-Matrix-Kontakte löst und sich an den im Vorderpol neugebildeten Kontakten nach vorne zieht. Alle drei geschilderten Teilprozesse sind vom Aktin-Filamentsystem abhängig, jedoch in unterschiedlicher Art und Weise. Der erste Abschnitt ist gekennzeichnet durch eine verstärkte **Aktin-Polymerisation** mit einer hohen Dynamik der Filamente. Die Führungslamelle am vorderen Zellpol stülpt hierbei dünne, blattartige Strukturen vor, die sogenannten **Lamellipodien**. Diese beinhalten ein dichtes Netzwerk an Aktin-Filamenten. Neben den Lamellipodien sind für diesen Bereich die **Filopodien** charakteristisch, die fingerförmige Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen und ihre Struktur durch eine parallele Anordnung der Aktin-Filamente erhalten. Bei beiden Strukturen liegen die Plus-Enden des Mikrofilamentsystems unterhalb der Plasmamembran, wo es dann aufgrund einer hohen Rate an Neupolymerisation lokal zur Ausstülpung der Plasmamembran in Form von Lamellipodien bzw. Filopodien kommt. Stellen diese beiden Strukturen schließlich Kontakt zum Substrat her, kommt es zur Ausbildung neuer Zell-Matrix-Kontakte, den sogenannten **fokalen Komplexen**, die dann zu fokalen Kontakten reifen (Rottner et al., 1999). Transmembran-Proteine der Plasmamembran, bekannt als **Integrine**, vermitteln hierbei den Kontakt zum Substrat, indem sie sowohl mit Proteinen der extrazellulären Matrix, als auch mit cytoplasmatischen Molekülen interagieren. Gebündelte Aktin-Filamente, die sogenannten **Streßfasern**, welche sich durch den gesamten Zellkörper erstrecken, enden in den oben erwähnten Kontaktstellen und erzeugen so eine Spannung innerhalb der Zelle.

Charakteristisch für Streßfasern ist, daß sie kontraktile Eigenschaften besitzen. Durch Interaktion ihrer Aktinbündel mit Myosinfilamentbündeln und ATP können sie sich verkürzen. Aus einem Gewebe herauswandernde Fibroblasten enthalten nur wenige Streßfasern, während ihre Zahl in nicht-motilen Fibroblasten stark ansteigt. Löst sich eine Zelle ganz vom Substrat ab, so verschwinden auch die Streßfasern. Sie bilden sich erst bei erneuter Anheftung der Zelle am Substrat. Offenbar wird durch die Ausbildung neuer Zell-Matrix-Kontakte eine Neuorganisation ungeordneter Aktin-Filamente in so hoch organisierte Strukturen wie den Streßfasern innerhalb einer Zelle induziert. Lamellipodien und Filopodien, die keinen Kontakt zum Substrat ausbilden, klappen als **Ruffles** über die Oberseite zur Zellmitte hin weg. Der Rüschainsaum verschwindet in diesem Bereich schließlich ganz. Im Gegensatz zur Vorwärtsbewegung, die im Bereich der Führunglamelle stattfindet, kommt es im hinteren Teil der Zelle aufgrund noch vorhandener Zell-Matrix-Kontakte zur Ausbildung einer **Retraktionsfaser**, die sich wegen der auf sie einwirkenden Zugkraft während des Lokomotionsvorganges stark verlängert. Schließlich zerreißt die Retraktionsfaser und ein kleines Stück von ihr bleibt am Substrat haften. Die Retraktionsfaser enthält ebenso wie Filopodien parallele Bündel an Aktin-Filamenten, die sich während des Bewegungsvorganges kontrahieren.

Abbildung I.1.1 bietet einen Eindruck von der Organisation einiger Aktin-Suprastrukturen in einer Zellkulturzelle, die sich gerade in dem Übergang zwischen stationärem und beweglichen Zustand befindet.

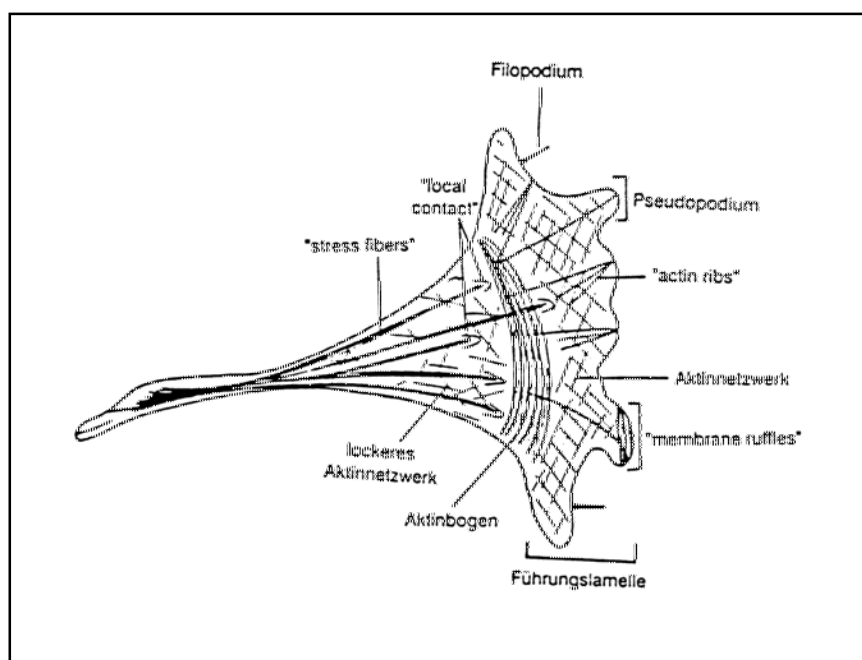


Abb.I.1.1: Verschiedene Organisationstypen von Aktin-Filamenten in einer Zellkulturzelle am Übergang zwischen stationärer und beweglicher Phase (nach Buß, 1991)

Streßfasern sind auffallende Strukturen des Aktin-Cytoskeletts von kultivierten Fibroblasten, die den gesamten Zellkörper durchziehen. Sie stellen kontraktile Bündel aus Aktin und MyosinII dar. Obwohl sie wesentlich schmäler und weniger organisiert sind, ähneln sie den Myofibrillen des Muskels. Regionen, die den Kontakt mit der extrazellulären Matrix vermitteln, werden fokale Kontakte genannt. Die Anheftung wird durch Transmembran-Proteine wie den Integrinen vermittelt. Am Übergang zwischen sessiler und motiler Phase liegt der Aktinbogen. Der Vorderpol eines sich bewegenden Fibroblasten stülpt im Bereich der Führungslamelle dünne, blattartige Membranstrukturen vor, die sogenannten Lamellipodien. Diese beinhalten ein dichtes Netzwerk an Aktin-Filamenten. Viele Zellen weisen zusätzlich fingerförmige Ausstülpungen unterschiedlicher Größe in diesem Bereich auf, die sogenannten Mikrospikes und Filopodien. Diese sind durch eine parallele Anordnung von Aktin-Bündeln charakterisiert. Bewegt sich die Zelle vorwärts, so klappen Lamellipodien und Mikrospikes bzw. Filopodien, die nicht an der extrazellulären Anheftung beteiligt sind, über die dorsale Oberfläche zum Zellinneren hin ab. Dadurch entsteht der sogenannte Ruffling-Phänotyp, der einem Rüschemsaum ähnelt.

In dieser Arbeit soll besonders auf die Organisation und Regulation des Aktinsystems eingegangen werden. An diesen Funktionen ist unter anderem das Protein Profilin beteiligt, welches sich an der Schnittstelle von Signaltransduktion und Cytoskelett befindet und wesentlich an der Regulation dieser Vorgänge beteiligt ist.

2. Profilin, ein Regulator des Mikrofilamentsystems

Profilin ist ein 12-16 kDa großes Protein, das 1977 zuerst von Carlsson und Mitarbeitern beschrieben worden ist. Profilogene wurden mittlerweile in allen bisher eukaryontischen Zellen sowie im Vaccinia-Virus nachgewiesen (Haarer et al., 1990; Machesky und Pollard, 1994; Sohn und Goldschmidt-Clermont, 1994; Sun et al., 1995; Blasco et al., 1991). Pflanzliches Profilin hat dabei als hochallergener Stoff medizinische Bedeutung erlangt (Valenta et al., 1992).

Für mehrzelligen Organismen ist Profilin essentiell. So sterben Profilin-„knock out“-Mäuse schon in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung (Witke et al., 1993) und auch Profilin defiziente Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind nicht lebensfähig (Verheyen und Cooley, 1994), ebenso einzellige Organismen wie die Hefe oder der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, die ohne Profilin in ihren Lebensäußerungen stark beeinträchtigt sind (Magdolen et al., 1988; Haarer et al., 1990; Haugwitz et al., 1994; Schlüter et al., 1998).

Profilin kommt in vielen Spezies in verschiedenen Isoformen vor, die teilweise von unterschiedlichen Genen kodiert sind. Bei einigen Spezies, wie zum Beispiel Mais (Staiger et

al., 1993), *Acanthamoeba* (Kaiser et al., 1986), *Dictyostelium discoideum* (Haugwitz et al., 1991) und *Physarum polycephalum* (Binette et al., 1990) kennt man solche Isoformen seit längerem. Bei Säugern hingegen wurde lange Zeit nur von einer Isoform ausgegangen (Kwiatkowski und Bruns, 1988; Kwiatkowski et al., 1990), doch auch hier sind mittlerweile je zwei Profilinisoformen bei Mensch, Rind und Maus bekannt (Honore' et al., 1993; Lambrechts et al., 1995; Witke et al., 1998). Die Profilinisoformen I und II unterscheiden sich in ihrer Expressionsrate für verschiedene Gewebe. Während humanes Profilin I in allen untersuchten Geweben auf hohem Niveau exprimiert wird, mit Ausnahme von Skelettmuskulatur, Herz und Gehirn, ist die Expressionsrate von humanem Profilin II besonders hoch im Gehirn (Honore' et al., 1993). Auch murines Profilin I wird in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme von Skelettmuskulatur auf hohem Niveau exprimiert, wohingegen Mausprofilin II besonders im Gehirn und auf niedrigem Niveau auch im Skelettmuskel zu finden ist (Witke et al., 1998). Zudem unterscheiden sich die Isoformen in ihrer Affinität zu bestimmten Interaktionspartnern .

2.1. Bindungspartner des Profilins

Für eine Reihe von Proteinen ist die Wechselwirkung mit Profilin gezeigt. Bisher sind drei Bindungsdomänen innerhalb des Profilinmoleküls eindeutig identifiziert worden. Es besitzt, neben einer Bindungsdomäne für Aktin oder Aktin-ähnliche Proteine, eine Wechselwirkungsstelle für saure Phospholipide und des weiteren eine Bindungsdomäne für poly-L-Prolinmotive, wie sie z.B. in Proteinen der Forminfamilie vorkommen. Daneben wird die Bindung von Annexin I und Phosphoinosit-3-Kinase an Profilin diskutiert, wobei aber nicht geklärt ist, an welche Region des Profilinmoleküls ihre Bindung erfolgt (Alvarez-Martinez et al., 1996 und 1997; Lu et al., 1996). Die Wechselwirkung mit Profilin über prolinhaltige Bereiche konnte bereits für VASP in Zellen nachgewiesen werden (Reinhard et al., 1995). Zu den Liganden, die ebenfalls mit dem Prolin-Bindungsmotiv des Profilins interagieren, gehören zusätzlich die Formine.

3. Die Proteinfamilie der Formine

Die Wechselwirkung von Profilin mit Vertretern dieser Proteinfamilie konnte für mDia1 (Watanabe et al., 1997), Bni 1p („bud neck involved 1 protein“) und Bnr 1p („bni1p related 1 protein“) (Evangelista et al., 1997; Imamura et al., 1997) sowie Cdc12p (Balasubramanian et al., 1994; Chang et al., 1997) gezeigt werden. Die Bindung erfolgt hierbei über die poly-L-Prolin-Bindungsstelle des Profilins.

Die Formine, die dieser Gruppe den Namen gaben, wurden aufgrund einer Mutation bei der Maus identifiziert, die Störungen des embryonalen Musters der Extremitätenausbildung aufwies (Woychik et al., 1985, 1990). Zu den forminähnlichen Proteinen gehören unter anderem die Proteine Diaphanous (Castrillon und Wasserman, 1994) und Cappucino (Emmons et al., 1995) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, Cdc12p und Fus1p der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Balasubramanian et al., 1994; Chang et al., 1997; Petersen et al., 1995), Bni1p und Bnr1p der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Zahner et al., 1996; Imamura et al., 1997), FigA des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* (Marhoul und Adams, 1995; Harris et al., 1997) und mDia1 (Watanabe et al., 1997), ein 140kDa großes Säuger-Homologes von Diaphanous, welches wiederum bei der Zellteilung und dadurch auch bei der Oogenese und Spermatogenese eine Rolle spielt.

Während die ursprünglichen Formine, allen voran das Formin IV, an der embryonalen Extremitätenentwicklung und Ausbildung der Niere beteiligt sind (Trumpf et al., 1992), spielen Diaphanous, Cappucino, Bni1p, Cdc12p und FigA eine Rolle bei der Cytokinese von Zellen (Castrillon und Wasserman, 1994; Verheyen und Cooley, 1994; Emmons et al., 1995; Balasubramanian et al., 1994; Marhoul und Adams, 1995; Harris et al., 1997). Fus1p dagegen ist an der Fusion von Spaltheife-Zellen beteiligt (Petersen et al., 1995). Überdies konnte für Cappucino, Bni1p, Cdc12p und FigA eine Rolle bei der Ausbildung der Zellpolarität nachgewiesen werden (Manseau et al., 1996; Zahner et al., 1996; Chang et al., 1997; Marhoul und Adams, 1995). Neben ihrer cytoplasmatischen Lokalisation wird für Formine eine Funktion innerhalb des Zellkerns diskutiert, da sie potentielle Kernlokalisierungssignale besitzen (Trumpf et al., 1992; Chan und Leder, 1996). Ein neues Mitglied dieser Proteinfamilie, FHOS („Formin Homology overexpressed in Spleen“), scheint besonders in der Milz angereichert zu sein, obwohl eine Funktion dieses Proteins bis jetzt nicht gezeigt werden konnte (Westendorf et al., 1999).

Formine sind in allen bis jetzt untersuchten Eukaryonten das Produkt multipler Gene. Die circa 1000-2000 Aminosäurereste forminähnlicher Proteine zeigen untereinander zwei

Sequenzbereiche, die als FH1- und FH2- Domänen („formin homology“) bezeichnet werden (Castrillon und Wasserman, 1994; Wasserman, 1998; Frazier und Field, 1997) und durch eine hohe Homologie gekennzeichnet sind (siehe Abb.I.1.2). Abbildung I.1.2 zeigt schematisch den Aufbau von mDia1 und anderen Protein der Formin-Familie, in diesem Fall Diaphanous, Bni1p, Formin und Cappucino.

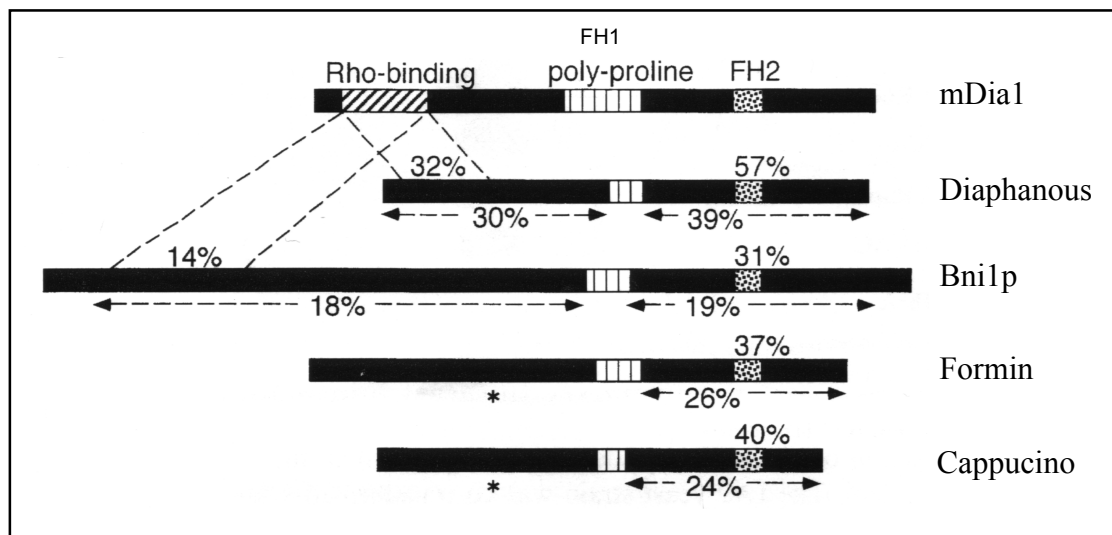


Abb. I.1.2: Schematische Darstellung einiger Vertreter der formin-verwandten Proteine.

Die Zahlen geben den Grad an Identität in Prozent auf Aminosäureebene im Vergleich zu mDia1 an. Sterne weisen auf keinerlei signifikante Homologie im N-Terminus zwischen mDia1 und Formin bzw. Cappucino hin. (nach Watanabe et al., 1997)

Die FH1-Domäne umfaßt typischerweise 100 Aminosäuren und ist durch ihren hohen Anteil an der Aminosäure Prolin charakterisiert, während die FH2-Domäne von einer etwa 130 Aminosäure großen, konservierten Region gebildet wird. Beide Formin-Domänen werden zusätzlich von möglichen „coiled-coil“-Regionen flankiert und sind durch etwa 160 Aminosäuren voneinander getrennt, die eine Sequenzähnlichkeit von 44-67% aufweisen (Harris et al., 1997; Lim et al., 1994). Neuerdings wird eine dritte FH-Domäne (FH3), welche sich im N-terminalen Bereich befinden soll, diskutiert (Petersen et al., 1998). Während für die FH2-Domäne bis jetzt keine Funktion gezeigt werden konnte, ist die FH3-Domäne essentiell für die korrekte Lokalisation des Spalthefe-Formins während der Konjugation (Petersen et al., 1998). Die FH1-Domänen der Formine aus *Saccharomyces cerevisiae*, der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, Insekten und der Maus werden als Bindungsmotiv für die poly-L-Prolin-Bindungsstelle des Profilins diskutiert bzw. konnten bereits identifiziert werden (Chang et al., 1997; Evangelista et al., 1997; Imamura et al., 1997; Manseau et al., 1996; Wasserman, 1998; Watanabe et al., 1997). Alle bekannten FH1-Domänen, bis auf die von Fus1p, enthalten mehrfache Wiederholungen von Prolinmotiven, die aus 5 bis 12 Prolinen

bestehen. Neben der Interaktion mit der Prolin-Bindungsstelle des Profilins wird ebenfalls eine Wechselwirkung mit SH3-Domänen (Lim et al., 1994; Ren et al., 1993) sowie eine Interaktion über WW-Domänen (Sudol, 1996) diskutiert. So interagiert ein Prolinmotiv des Formins mit den SH3-Domänen der Tyrosinkinase Abl und Fyn sowie mit der SH3-Domäne des Cytoskelettproteins Cortactin, einem Substrat der Tyrosinkinase Src, das an der Reorganisation des Cytoskeletts nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren beteiligt zu sein scheint (Cicchetti et al., 1992; Ren et al., 1993; Chan et al., 1996; Wu et al., 1991; Zhan et al., 1994). Zudem wurden Formin-bindende Proteine (FBPs) charakterisiert, die über eine WW-Domäne an die Prolinmotive der Formine binden (Chan et al., 1996).

Forminähnliche Proteine gehen aber nicht nur über die prolinreichen Regionen Bindungen mit anderen Proteinen ein. Für einige Vertreter dieser Proteinfamilie wurde die direkte Interaktion mit kleinen G-Proteinen der Rho-Familie nachgewiesen. Bni1p bindet an die aktive Form von Rho1p und Cdc42p (Kohno et al., 1996; Evangelista et al., 1997), während mDia1 an GTP-RhoA bindet (Watanabe et al., 1997). Die Bindungsstelle für die Interaktion mit den kleinen GTPasen befindet sich im N-terminalen Bereich des jeweiligen forminähnlichen Proteins.

Da Mitglieder dieser Proteinfamilie sowohl mit Profilin, als auch mit Vertretern der kleinen GTPasen interagieren können, sind sie Verbindungsproteine zwischen der Signaltransduktion und dem Aktin-Cytoskelett.

2.2. Das forminähnliche Protein mDia1

mDia1 gehört zu den Vertretern der forminähnlichen Proteine, für die Wechselwirkungen sowohl mit Proteinen der Signaltransduktionskaskade, als auch mit cytoskelettalen Vertretern gezeigt werden konnte. Bei mDia1 handelt es sich um ein Maus-Homologes des *Drosophila melanogaster* Proteins Diaphanous, welches eine Rolle bei der Cytokinese von Zellen spielt (Castrillon und Wasserman; 1994). mDia1 ist ein „downstream“ Effektor der kleinen GTPase RhoA, mit dem es über seine Rho-Bindungsdomäne, welche sich im N-Terminus des Proteins befindet, interagiert. Es wechselwirkt dabei hauptsächlich mit der GTP-gebundenen Form dieser kleinen GTPase. Eine schwache Interaktion mit GDP-Rho, also der inaktiven Form, wird diskutiert (Watanabe et al., 1997, Watanabe et al., 1999). Zudem enthält es wie alle forminverwandten Proteine die für sie charakteristischen FH1- und FH2-Domänen. Die

prolinreiche FH1-Region enthält dabei 14 sich wiederholende poly-L-Prolin-Abschnitte, die durch das IPPPPPLPG-Motiv bzw. ähnliche Sequenzen charakterisiert werden (Watanabe et al., 1997). Die Interaktion mit Profilin konnte in *in vitro* Experimenten bereits nachgewiesen werden (Watanabe et al., 1997). Mittels Immunfluoreszenz wurde mDia1 in Zellregionen mit hoher Aktindynamik lokalisiert, so in der Führungslamelle motiler Zellen, in Membranauffaltungen („Ruffles“) und in der Teilungsfurche während der Cytokinese (Watanabe et al., 1997). Zudem konnte eine Kolo-kalisation von mDia1 mit Profilin und RhoA in diesen Zellbereichen nachgewiesen werden.

Bis zum Beginn dieser Arbeit lagen jedoch keine *in vivo* Daten vor, die die Hypothese, daß die Wechselwirkung von mDia1 mit Profilin über die FH1-Domäne bzw. die Prolin-Bindungsstelle des Profilins vermittelt wird, experimentell unterstützten. Eine Funktion der FH2-Domäne in mDia1, ebenso wie für andere Mitglieder dieser Familie, konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

Mittlerweile wird für mDia1 auch eine intramolekulare Interaktion zwischen dessen N-Terminus und dem C-terminalen Ende des Proteins diskutiert (Watanabe et al., 1999). Erst nach der Aktivierung des Proteins durch die GTP-gebundene Form der kleinen GTPase Rho wird diese Wechselwirkung gelöst und es kommt zur Signalweiterleitung. So kolo-kalisieren RhoA, mDia1 und Profilin an dynamischen Plasmamembranabschnitten, z.B. nach Stimulation mit Phorbolestern, so daß eine lokale Aktinpolymerisation an diesen Membranabschnitten wahrscheinlich scheint (Watanabe et al., 1997). Ob und wie in diesem Zusammenhang die Rho-assoziierte Kinase ROCK eine Rolle spielt, ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, daß GTP-Rho die Formierung unterschiedlicher Streßfaser-Typen durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den Reaktionskaskaden, welche entweder über mDia1 und Profilin bzw. ROCK vermittelt werden, beeinflußt (Watanabe et al., 1999).

Kürzlich wurde eine weitere murine Isoform, mDia2, des *Diaphanous* Proteins entdeckt (Tominaga et al., 2000). Dieses Protein ist in der Lage Rho- und Src Tyrosin-Kinase-Signaltransduktionswege miteinander zu verbinden. „Aktiviertes“ mDia2, dem die N-terminal gelegene Rho-Bindungsdomäne fehlt, kooperiert mit der Rho-Kinase bzw. ROCK bei der Bildung von Streßfasern (siehe Abb.I.1.1). Desweiteren aktiviert dieses Protein den „Serum Response Factor“ (SRF). Diese Effekte sind ebenfalls für mDia1 beschrieben worden (Tominaga et al., 2000).

Das humane Homologe hDia1 des *Drosophila melanogaster* Proteins *Diaphanous* ist biomedizinisch interessant. Genetische Untersuchungen einer Großfamilie aus Costa Rica zeigen, daß eine Mutation in diesem Gen, welche zu einem verkürzten Protein führt, in dem die letzten 52 Aminosäuren durch 21 aberrante ersetzt sind, spätestens mit Beginn des 30. Lebensjahres vollständig taub sind. Die Krankheit wird autosomal dominant vererbt (Lynch et al., 1997). Bis jetzt ist es ungeklärt, wie das C-terminal verkürzte Protein dieses Krankheitsbild auslöst.

Neben hDia1 gibt es ein weiteres humanes Homologes (DIA) des Diaphanous Proteins, das bei der Entwicklung der Ovarien eine Rolle spielt (Bione et al., 1998). Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Taubheit, sind bei diesem Krankheitsbild unterschiedliche Genloci beteiligt, die die Störung in der Ovarienbildung verursachen, man spricht auch von „Premature Ovarian Failure“ (POF) (Bione et al., 1998).

Es scheint, daß die verschiedenen Mitglieder der DIA-Proteinfamilie von einem einzelnen dia-Gen abstammen und neben einer allgemeinen Rolle innerhalb der Zellen spezifische Funktionen in hochspezialisierten Zellen wie den Follikelzellen des Ovars oder den Haarzellen des Innenohrs entwickelt haben.

3. Die Rho Familie der kleinen GTPasen

Die Familie der Rho GTPasen umfaßt bis jetzt 14 Mitglieder in Säuger-Zellen, nämlich Rac1-3, Cdc42, TC10, RhoA-E, G, H sowie Rnd1 und 2 (Aspenström, 1999). Die prominentesten und am besten charakterisierten Mitglieder dieser Proteinfamilie sind die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42. Diese sind an der Regulation vieler unterschiedlicher Aktivitäten des Cytoskeletts beteiligt (Hall, 1998; Machesky und Hall, 1996; Nobes und Hall, 1995; Ridley, 1996). So stimuliert Rho in Maus-Fibroblasten die Synthese von Stressfasern und fokalen Kontakten (siehe Abb.I.1.1), während es bei der Cytokinese für die Induktion und Aufrechterhaltung des kontraktilen Teilungsringes verantwortlich ist (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996; Narumiya, 1996; Ridley und Hall, 1992). Die kleine GTPase Rac induziert Ruffling an der Peripherie der Zelle, sowie die Bildung kleiner fokaler Komplexe (Nobes und Hall, 1995; Ridley et al., 1992; Rottner et al. 1999). Zusätzlich scheint Rac ein essentieller Aktivator der NADPH Oxidase in Phagocyten zu sein (Ridley, 1995). Die Aktivität der Bildung kleiner fokaler Komplexe ist ebenfalls für Cdc42 charakteristisch.

Daneben induziert diese GTPase aber noch die Bildung von Filopodien (siehe Abb.I.1.1) und ist für die Ausbildung der Zellpolarität verantwortlich (Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995; Nobes und Hall, 1999). Zelluläre Motilität beinhaltet die koordinierte Extension von Lamellipodien und Filopodien im Bereich der Führungslamelle (siehe Abb.I.1.1). Rho, Rac und Cdc42 spielen demnach eine wichtige Rolle in diesem Prozess (Stasia et al., 1991; Takaishi et al., 1993; Ridley et al., 1995; Nobes und Hall, 1999).

Charakteristisch für die Proteinfamilie der kleinen GTPasen ist der Wechsel zwischen einer aktiven Form, bei der GTP gebunden wird, und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form. Der Übergang zwischen diesen beiden Aktivitätszuständen wird durch Nukleotid-Austauscher, GTPase-aktivierende Proteine und Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren herbeigeführt. Die Menge an aktivem GTP-Rho wird durch die sogenannten Nukleotid-Austauscher („guanine-nucleotide exchange factors, GEFs“) reguliert, während GTPase aktivierende Proteine („GAPs“) die intrinsische GTPase-Aktivität dieser Proteinfamilie stimulieren. Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren beeinflussen ebenfalls das Gleichgewicht zwischen den beiden Aktivitätszuständen, indem sie die Dissoziation des gebundenen GDPs herabsetzen und dadurch den inaktiven Konformationszustand begünstigen (Boguski und McCormick, 1993; Ridley, 1995). Die Aktivierung der kleinen GTPasen erfolgt demnach über die Nukleotid-Austauscher, welche ihrerseits wiederum durch Transmembran-Rezeptoren aktiviert werden. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierungskaskade ist aber weitgehend unbekannt (Aspenström, 1999a; Aspenström, 1999b; Hall, 1998). Die Signaltransduktionskaskade wird dann über verschiedene Effektoren weitergeleitet, deren genaue Funktion in den meisten Fällen ungeklärt ist (Aspenström, 1999a; Tapon und Hall, 1997). Zu den am besten charakterisierten Effektoren der kleinen GTPase Cdc42 gehören die Wiskott-Aldrich Syndrom Proteine WASP und N-WASP, die an der Organisation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sind (Zicha et al., 1998; Badolato et al., 1998; Miki et al., 1998). Ein weiterer Effektor ist IQGAP1/2, welcher zusätzlich ein Effektor der kleinen GTPase Rac ist. Dieser Effektor bindet direkt an Aktin-Filamente, welche dadurch vernetzt werden (Machesky, 1998). Wie oben bereits erwähnt, stellen Proteine der Formin-Familie wichtige Effektoren von Rho dar, indem sie die kleine GTPase mit dem Cytoskelett verbinden (Wasserman, 1998). Ein prominenter Vertreter dieser Effektoren ist mDia1 (Watanabe et al., 1997; Watanabe et al., 1999).

Zwischen den Vertretern der Rho Familie der kleinen GTPasen scheint im Hinblick auf ihre Funktion eine Hierarchie zu bestehen. So aktiviert Cdc42 nach einer Weile Rac, welches wiederum Rho Aktivität induzieren kann. Dies wird dadurch erkennbar, daß der für die

jeweilige GTPase charakteristische Phänotyp sichtbar wird, also im Falle von Rac peripheres Zellruffling bzw. bei Rho Induktion von Streßfasern und großen fokalen Kontakten (Zigmond, 1996).

5. Aufgabenstellung

Profilin steht an der Nahtstelle zwischen Signaltransduktion und Aktin-Cytoskelett. mDia1 als Mitglied der forminähnlichen Proteine interagiert sowohl mit Vertretern der kleinen GTPasen, nämlich RhoA, als auch mit Profilin und ist dadurch scheinbar als Verbindungsprotein zwischen Signaltransduktion und Aktin-Cytoskelett prädestiniert.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung funktioneller Domänen des mDia1 Proteins. Dazu gehörte die Charakterisierung der Profilin-Bindungsstelle in Zellen, da bei Beginn dieser Arbeit lediglich *in vitro* Daten über die Wechselwirkung dieser beiden Proteine vorhanden waren. Zusätzlich wurde die Funktion der Rho-Bindungsdomäne von mDia1 näher charakterisiert, da diese nach Expression in Zellen extensives Membranruffling, Veränderungen der Zellokomotion und eine Änderung des Verhaltens während des Zellausbreitens induziert.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und ICN (Eschwege) bezogen. Bezugsquelle für Enzyme waren die Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Appligene (Heidelberg), wenn nicht anders vermerkt.

1.2. Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli*-Stämme eingesetzt:

DH5 α *endA1*, *supE44*, $\phi 80lacZ\Delta M15$ (Hanahan, 1983)

XL1blue F $'::Tn10$ *proA⁺B⁺ lacI^q $\Delta(lacZ)M15/recA1$ endA1 gyrA96(Nal^r) thi hsdR17 (r_K⁻m_K⁻) supE44 relA1 lac* (Bullock et al., 1987)

BL 21 (DE) F $'$, *ompT*, r_B⁻m_B⁻, *hsdS* gal (λ clts857, *ind1*, Sam7, *nin5*, *lac* UV5-T7 gene1) (Studier und Moffat, 1986)

1.3. Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme eingesetzt:

SFY 256: MATa, *ura* 3-52, *his* 3-200, *ade* 2-101, *lys* 2-801, *trp* 1-901, *leu* 2-3, 112, *can*^r, *gal* 4-542, *gal* 80-538, *Ura3::GAL* 1-*lacZ* (Bartel et al., 1993)

Reportergen: *lacZ*

Auxotrophiemarker: *trp1*, *leu2*

HF7c: MATa, *ura* 3-52, *his* 3-200, *ade* 2-101, *lys* 2-801, *trp* 1-901, *leu* 2-3, 112, *can*^r, *gal* 4-542, *gal* 80-538, *URA3:: (GAL* 17-mers)₃-CYC1-*lacZ* (Feilotter, H., Hannon G. und Beach, D., unveröffentlicht (aus: Qiagen Handbuch, 1997))

Reportergen: *lacZ*, *HIS3*

Auxotrophiemarker: *trp1*, *leu2*

1.4. Zellen

Folgende Zell-Linien wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

PtK₂: Epithelzellen, Beutelratte, Niere (ATCC, CRL-66494, Rockville, MD)

HeLa: Epithelienartige Adenocarcinoma-Zellen, Mensch, Gebärmutter (ATCC, CCL-2, Rockville, MD)

CHO-K1: Fibroblasten, Chinesischer Hamster, Ovarien (DSMZ, ACC 110, Braunschweig)

1.5. Vektoren

Expressionssysteme für Hefen:

pGAD424 (Clontech, Heidelberg): GAL4₍₁₋₁₄₇₎ DNA-Bindungsdomäne, TRP1, ADH1-Promoter, amp^r

pGBT9 (Clontech, Heidelberg): GAL4₍₇₆₈₋₈₈₁₎ Aktivierungsdomäne, LEU2, ADH1-Promoter, amp^r

Expressionssysteme für Bakterien:

pET28a (Novagen, Heidelberg): T7-Promoter, kan^r

Expressionssysteme für Zellkultur-Zellen:

pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande): T7- und SP6-Promoter, SV40-Promoter, amp^r, neo^r
Dieser Vektor wurde in unserem Labor durch die Einführung des Birkenprofilin-Tags (siehe 1.6.) modifiziert.

pEGFP-C2 (Clontech, Heidelberg): CMV IE-Promotor, kan^R, G418^R, Reportergen EGFP (GFPmut1 Variante)

1.6. Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

Klonierung und Sequenzierung von mDia1-Fragmenten

„M13 Reverse Primer“ (Pharmacia, Upsala, Schweden)

„M13 Universal Primer“ (Pharmacia, Upsala, Schweden)

Primer 1 (pGBT9, Clontech, Heidelberg)

Primer 2 (pGAD424, Clontech, Heidelberg)

mDia1 (XmaIII)

5'-AAT TCC ATA TGG AGC CGT CCG GCG GGG GGC CTG GGG CCC-3'

3'-GG TAT ACC TCG GCA GGC CGC CCC CCG GAC CCC GGG CCG G-5'

mDia1 (EcoRI/BclI)

5'-AAT TCC ATA TGC AGA TTG ATA TTG AGA GAT TGG TT-3'

3'-GG TAT CAG TCT AAC TAT AAC TCT CTA ACC AAC TAG-5'

mDia1 (EcoRI/BsaWI)

5'-AAT TCC ATA TGG TTT ATA AGC CAG AGG TGC AGC T-3'

3'-GG TAT ACC AAA TAT TCG GTC TCC ACG TCG AGG CC-5'

mDia1 (EcoRI/SpHI)

5'-AAT TCC ATA TGG AGA TCG TGT CTG TCA CCG CCG CAT G-3'

3'-GG TAT ACC TCT AGC ACA GAC AGT GGC GGC-5'

mDia1 (BsaWI/SalI)

5'-CCG GAG GCC AAA CTG GTC CAA GTT TGT GGC TG-3'

3'-TC CGG TTT GAC CAG GTT CAA ACA CCG ACA GCT-5'

mDia1 (EcoRI/BamHI)

5'-AAT TCA AGC TTC ATA TGC GGC CGC CCG GGC CG-3'

3'-GT TCG AAG TAT ACG CCG GCG GGC CCG GCC TAG-5'

mDia1 (EcoRI/BamHI)

5'-AAT TCA AGC TTC ATA TGC GGC CGC CCG GGC G-3'

3'-GT TCG AAG TAT ACG CCG GCG GGC CCG CCT AG-5'

Birkenprofilin-Tag

Biprot HindIII

5'-AGC TTC CTT CCC ACA GTT TAA GCC TCA GGA AAT CTA GC-3'

3'-AG GAA GGG TGT CAA ATT CGG AGT CCT TTA GAT CGA GCT-5'

1.7. Medien und Lösungen

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in LB-Vollmedium:

LB-Vollmedium: 10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefeextrakt

Mit H₂O_{deion} wurde auf 1 Liter gefüllt und mit NaOH pH 7,5 eingestellt

Für LB-Agar wurde 1,5% (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Zur Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium mit 150µg/ml Ampicillin und/oder 30µg/ml Kanamycin supplementiert.

Die Anzucht von *S.cerevisiae* vor der Transformation erfolgte in YPD-Medium:

YPD-Vollmedium: 20g Pepton, 10g Hefeextrakt

Mit Leitungswasser wurde auf 950 ml gefüllt und mit HCl pH 5,8 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml 40% sterile Saccharose-Lösung zugeben.

Für YPD-Agar wurde 1,5% (w/v) Agar-Agar hinzugegeben.

Um Bakterienkontaminationen zu vermeiden, wurde das Medium mit 150µg/ml Ampicillin supplementiert.

Die Anzucht von *S.cerevisiae* erfolgte in SD synthetischem Medium:

SD synthetisches Medium: 6,7g Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren (Difco, Hamburg)

Mit Leitungswasser wurde auf 850 ml gefüllt und mit HCl pH 5,8 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurden 50ml 40% sterile Saccharose-Lösung zugeben.

Für SD-Agar wurde 1,5% (w/v) Agar-Agar hinzugegeben. Um Bakterienkontaminationen zu vermeiden, wurde das Medium mit 150µg/ml Ampicillin supplementiert.

10x Aminosäurelösung: Je nach gewünschtem Selektionsmedium, wurden die entsprechenden Aminosäuren weggelassen.

300mg L-Isoleucin
1500mg L-Valin
200mg Adenin-Hemisulfatsalz
200mg L-Arginin HCl
200mg L-Histidin-Monohydrat
1000mg L-Leucin
300mg L-Lysin HCl
200mg L-Methionin
500mg Phenylalanin
2000mg L-Threonin
200mg L-Tryptophan
300mg L-Tyrosin
200mg Uracil

Mit Leitungswasser auf wurde auf 1 Liter gefüllt, pH 5,8 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder Ham's F12/DMEM unter Zusatz von 10% fötalem Rinderserum (FCS):

DMEM + 10% FCS:

13,38g DMEM (Life Technologies) wurden mit 1,5g NaHCO₃, 10ml 0,2M N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin (Biochrom, Berlin) sowie mit 100ml FCS (PAA) versetzt. Anschließend wurde mit H₂O auf 1 Liter gefüllt.

Ham's F12/DMEM + 10% FCS:

Zu 12,12g DMEM/Ham's F12 (1:1) (Biochrom, Berlin) wurden 100ml FCS (PAA) gegeben und mit H₂O auf 1 Liter gefüllt.

Als physiologische Lösung wurde in verschiedenen Experimenten PBS eingesetzt:

PBS:

136mM NaCl, 3mM KCl, 8mM NaH₂PO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,2

1.8. Antikörper

Nachfolgend eine Auflistung der verwendeten Antikörper und ihrer Verwendung:

Monoklonale Antikörper:

	Antigen	Ig-Klasse	Art	Verd. Immunblot	Verd. Immunfluoreszenz	Firma
2H11	Profilin	IgG	Zellkultur-überstand	1:2	unverdünnt	-
4A6	Birkenprofilin	IgG	Zellkultur-überstand	unverdünnt	unverdünnt	-
Anti-p140mDia	p140mDia	IgG	Glycerin-Stock	1:500	-	Becton-Dickinson GmbH
Anti-Vinculin	Vinculin	IgG	Glycerin-Stock	-	1:1600	Sigma
Anti-RhoA	RhoA	IgG	Glycerin-Stock	1:100	-	Becton-Dickinson GmbH
Anti-Myc	Myc-Tag	IgG	Zellkultur-Überstand	1:10	unverdünnt	-
Anti-Flag	Flag-Tag	IgG	Glycerin-Stock	-	1:1600	Sigma

Polyklonale Antiseren:

	Antigen	Ig Klasse	Art	Verd. Immunblot	Verd. Immunfluoreszenz	Firma
Anti-Rinderprofilin	Rinderprofilin (Buß, 1991)	IgG	Kaninchen-serum	-	1:30	-
Anti-RhoA	RhoA	IgG	Serum, Glycerin-Stock	-	1:10	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rac1	Rac1	IgG	Serum, Glycerin-Stock	-	1:10	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ezrin	Humanes Ezrin	IgG	Serum	-	1:100	Spende von Dr. Paul Manjeard, Monpellier

Mit Fluorochromen oder Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Antikörper:

- Kaninchen-Anti-Maus-IgG-HRP, 1:2000 im Immunoblot (Dianova, Hamburg)
- Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:2000 im Immunoblot (Dianova, Hamburg)
- Ziege-Anti-Maus-IgG-TRITC (Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat), 1:100 in der indirekten Immunfluoreszenz (Dianova, Hamburg)
- Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-TRITC, 1:100 in der indirekten Immunfluoreszenz (Dianova, Hamburg)
- Ziege-Anti-Maus-IgG-FITC (Fluorescein-Isouthiocyanat), 1:100 in der indirekten Immunfluoreszenz (Dianova, Hamburg)
- Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-FITC, 1:100 in der indirekten Immunfluoreszenz (Dianova, Hamburg)

1.9. Geräte

- | | | |
|---|--------------------------------|--|
| - | Thermocycler | Biozym (Hess. Oldendorf) |
| - | Kühlzentrifuge J2-MC | Beckmann (München) |
| - | Eppifuge | Sigma (Deisenhofen) |
| - | Fluoreszenz-Mikroskop Axiophot | Zeiss (Jena) |
| - | Photometer Uvikon 922 | Bio-Tek Kontron Instruments (Mailand, Italien) |

Alle weiteren Geräte werden unter den einzelnen Methoden genannt.

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Anzucht von *E.coli*

Für die Anzucht von *E.coli* wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen von LB-Medium mit Einzelkolonien von einer Agar-Platte oder aus Flüssig-Vorkultur (1:50 bis 1:100) bzw. mit Hilfe einer Impföse aus Gefrierkulturen (s.u.) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert (kleine Volumina im Kulturröhrchen im Roller, größere Volumina im Kulturkolben bei 220 rpm im Schüttelinkubator).

Über-Nacht-Kulturen von *E.coli* konnten im Verhältnis 1:5 mit sterilem Glycerin versetzt und über Monate gelagert werden.

2.1.2. Herstellung kompetenter *E.coli* für die Transformation

Um *E.coli* für die Aufnahme von nackter DNA zu befähigen, wurden 250ml Kultur des entsprechenden *E.coli*-Stammes in LB-Medium bei 18°C und 200–250 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD von 0,6 bei 600 nm inkubiert. Alle Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt und die folgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde auf Zentrifugengefäße verteilt und 10 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2500 x g und 4°C wurden die sedimentierten Bakterien in 80ml TB-Puffer (10mM Pipes pH 6,7, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, vor Gebrauch mit 55mM MnCl₂ versetzen) resuspendiert. Danach wurde die Suspension erst 10 min auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert und die Bakterien dann in 20ml TB + 7% DMSO unter ständigem Rühren aufgenommen und nochmals für 10 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden zu 200µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.1.3. Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E.coli* wurden 200 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10-500ng DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Temperaturschock auf 42°C für 1 min, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis für 5 min.

Anschließend wurden 700µl LB-Medium zugegeben und 30-45 min bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der transformierten *E.coli*-Klone wurde der Transformationsansatz auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, die sich im Arbeitsaufwand sowie im Reinheitsgrad des Produktes unterscheiden. Entsprechend den experimentellen Anforderungen wurde eine der im folgenden beschriebenen Methoden verwendet.

Plasmid-Minipräparation

Diese Methode ist geeignet zur schnellen, simultanen Plasmidpräparation aus vielen unterschiedlichen Bakterien-Kolonien für Klonanalysen mit Restriktionsenzymen. Diese Präparation gilt nicht für Endonuklease A-positive *E.coli*-Stämme.

Mit einer zusätzlichen Extraktion mittels PEG konnte die DNA auch für die automatische Sequenzierung verwendet werden.

1,5 ml einer stationären Bakterienkultur wurden 5 min bei 1000 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und das Pellet in 165µl TELT (2,5M LiCl, 50mM TRIS-HCl pH 7,5; 62,5mM EDTA, 0,4% (v/v) Triton X-100) mit 1mg/ml Lysozym aufgenommen und gut gemischt. Nach den Inkubationen: 5 min RT, 2 min 95°C und 5 min 0°C wurden die denaturierten Proteine, Zellfragmente und chromosomale DNA durch Zentrifugation bei 13000 x g (RT) für 8 min sedimentiert. Die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA wurde mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation bei 13000 x g (RT) für 15 min sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA in sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert und RNA-Verunreinigungen durch Zusatz von 1µl 1mg/ml RNase A (Sigma, Deisenhofen) und Inkubation für 2 bis 5 min bei RT entfernt.

Plasmid-Präparation mit Qiagen-Säulen

Qualitativ hochwertige DNA konnte mit Hilfe des „Qiagen Plasmid Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranleitung präpariert werden. Das DNA-Pellet wurde nach der Präparation in sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert.

Die auf diese Weise hergestellte DNA konnte sofort für Sequenzierungen bzw. transiente Transfektionen eingesetzt werden.

2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA (doppelsträngig) in wässriger Lösung erfolgte über die OD bei 260 nm, wobei eine OD von 1 etwa 50 µg/ml DNA entspricht. Außerdem konnte die DNA-Konzentration im Agarosegel (siehe II.2.1.9.) vergleichend mit Marker-DNA abgeschätzt werden, indem letztere mit definierten Konzentrationen eingesetzt wurde.

2.1.6. DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme spalten DNA durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen Erkennungssequenzen. Endonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische DNA-Sequenzen aus 4-8 Nukleotiden und schneiden diese in Anwesenheit von MgCl₂. Sie erzeugen dabei, enzymabhängig, einzelsträngige, überstehende („sticky“) oder doppelsträngige, glatte („blunt“) Enden. Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt.

Pro Ansatz wurden für analytische Zwecke 0,2–2 µg und für präparative Zwecke 1–5 µg DNA eingesetzt, bei einem Reaktionsvolumen von 10–50 µl und 0,5–1 U Enzym pro µg DNA.

2.1.7. Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-DNA-Enden

Die Dephosphorylierung vektorieller DNA-Enden ist eine effiziente Methode zur Unterbindung der Rezirkularisierung von Vektor-DNA und steigert damit die *in vitro*-Neukombination von DNA-Fragmenten. Verwendet wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP: shrimps alkaline phosphatase, Pharmacia) und der mitgelieferte Reaktionspuffer nach Herstellerangaben.

2.1.8. *In vitro*-Neukombination von DNA-Fragmenten und Selektion rekombinanter Klone

Ligasen sind Enzyme, die DNA-Fragmente durch Knüpfen einer Phosphodiester-Bindung kovalent miteinander verbinden. Für die spezifische Insertion der Fragmente in Vektoren wurde die T4-Ligase der Firma Appligen (Heidelberg) in dem mitgelieferten Puffersystem verwendet. In einem Gesamtvolumen von 10-20µl wurden etwa 100–500ng DNA mit 2–5U T4-Ligase über Nacht bei 4°C oder für 3 h bei RT inkubiert. Das molare Verhältnis von Insert-DNA zu Plasmid-DNA betrug 1:3 bis 1:8. Anschließend wurde der Ansatz direkt oder nach Lagerung bei –20°C zur Transformation kompetenter *E.coli* verwendet.

2.1.9. Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Agarosegelen durchgeführt. Die Agarose-Konzentrationen wurden in Abhängigkeit der Fragmentgröße gewählt (siehe Tabelle II.1; Sambrook et al., 1989) und die Agarose direkt mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Für die Agarosegele und die Elektrophorese wurde das TBE-Puffersystem sowie Horizontalgelkammern der Größen 7cm x 10cm und 14cm x 14cm benutzt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben 1:5 mit Gelladepuffer (je 0,1% (w/v) Bromphenolblau und Xylencyanol, 30% (v/v) Glycerin in 5-fach konzentriertem TBE) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 10–15V pro cm Gellänge. Im Anschluß wurden die Gele im UV-Durchlicht fotografiert. Als Größenstandard diente die EcoRI/HindIII-hydrolysierte DNA des Bakteriophagen λ. (siehe Tabelle II.2).

Tab. II.1: Agarosekonzentration für die optimale Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese (nach Sambrook et al., 1989)

<u>Konzentration [% (w/v)]</u>	<u>Trennbereich [kb]</u>
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-4
2,0	0,1-3

Tab II.2: DNA-Fragmente des Bakteriophagen λ nach Hydrolyse mit den Restriktionendonukleasen EcoRI und HindIII (nach Sambrook et al., 1989)

Fragmentlänge [bp]
21800
5240
5050
4210
3410
1980
1919
1570
1320
930
840
580
130

5-fach TBE: 54g TRIS
27,5g Borsäure
20ml 0,5M EDTA pH 8.0
mit H₂O_{dest} ad 1 Liter

2.1.10. DNA-Fragmentisolierung

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Hydrolyse von Plasmiden mit Restriktionsenzymen und Auftrennung im Gel wurden zwei Methoden angewandt. Die Effizienz der Fragmentisolierung wurde jeweils mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

DNA-Fragmentisolierung mit Jetsorb (Genomed, Bad Oeynhausen)

Die Banden der zu isolierenden DNA-Fragmente wurden knapp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die Fragmentisolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

DNA-Fragmentisolierung mit Qiagen (Qiagen, Hilden)

Die Banden der zu isolierenden DNA-Fragmente wurden knapp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die Fragmentisolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.1.11. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung aufgereinigter DNA wurde diese zuerst Mittels PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthielt neben der DNA-Polymerase und den Primern zusätzlich mit einem Farbstoff-markierte Didesoxynukleotide, die eine vorzeitige Termination der DNA-Synthese bewirken, wenn sie durch die Polymerase in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden.

Reaktionsansatz:

Premix:	2µl (ABI)
DNA-Template:	
ssDNA	50ng
dsDNA	250ng
PCR-Produkt(0,2-0,5kb)	10-50ng
Primer	10pmol
H ₂ O	ad 10µl

Nach der PCR wurde zu dem obigen, sogenannten Mastermix, 10µl H₂O und 2µl 3M Natriumacetat (pH 4,6, in MQ-Wasser) hinzugegeben. Nach Überführung in ein 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, erfolgte die Zugabe von 55µl 96% Ethanol (reinst), der sich eine 15-30 minütige Zentrifugation (RT, „fullspeed“ in einer Eppendorf-Reaktionsgefäß-Zentrifuge) anschloß. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit 250µl 70% Ethanol gewaschen, anschließend erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum abgenommen. Das Pellet wurde anschließend im Trockenschrank getrocknet und dann in 13µl TSR (Template Supression Reagent, ABI) resuspendiert. Nach einer 2 minütigen Inkubation bei 90°C, wurde der Reaktionsansatz 10 min auf Eis abgekühlt, dann in Sequencer-Reaktionsgefäße überführt. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte in einem AbiPrism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.1.12 Interaktionstest zweier Proteine im „Yeast two-hybrid system“

Das „Yeast two-hybrid system“ ermöglicht eine Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen in Hefezellen und ist insbesondere für den Nachweis transienter oder schwacher Wechselwirkungen geeignet. Dieser Assay basiert auf der räumlichen Trennung von DNA-bindender und transkriptionsaktivierender Domäne vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Während die DNA-bindende Domäne die Bindung des Transkriptionsfaktors an stromaufwärts von dem entsprechenden Transkriptionsstartpunkt gelegene, regulatorische DNA-Sequenzen ermöglicht, sind transkriptionsaktivierende Domänen für die Initiation der Transkription erforderlich. Da die funktionellen Eigenschaften auch bei einer solchen physikalischen Trennung der beiden Domänen erhalten bleiben, lassen sich Interaktionen von Proteinen über die Rekonstitution des intakten Transkriptionsfaktors nachweisen (Übersicht in: Fritz und Green, 1992; Fields und Sternglanz, 1994).

Um die Wechselwirkung bekannter Proteine im „Yeast two-hybrid system“ („MATCHMAKER two-hybrid system“, Clontech, Heidelberg) zu untersuchen, wurde die cDNA-Sequenz der Proteine in die Hefe-Expressionsvektoren für das „Two-hybrid system“ (siehe auch 1.5.) kloniert und diese in die Hefestämme SFY526 und HF7c (siehe auch 1.3.) transformiert. Die Hefen wurden auf Leucin- und/oder Tryptophan-SD-Mangel-Platten (siehe 1.7.) aufgebracht und bei 30°C für 3 bis 5 Tage inkubiert. Die Interaktion der exprimierten Fusionsproteine wurde dann durch einen β -Galaktosidase-Assay gezeigt.

Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurden Schüttelkulturen der Hefestämme über Nacht bei 30°C und 240 rpm in YPD/Ampicillin-Medium gezogen, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,4 verdünnt und für weitere 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Hefesuspension wurde zentrifugiert, das Sediment mit Wasser gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 1,5 ml aus Stammlösungen frisch angesetzt, sterilem 1x TE/LiAc pro 300 ml Ausgangskultur resuspendiert (10x TE: 0,1M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7,5; 10x LiAc: 1M Lithiumacetat, pH 7,5). Die Kompetenz der Hefezellen blieb für 3 Stunden bei RT erhalten.

Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Transformation der Hefen wurden 0,05 bis 0,2 µg einer oder beider Plasmid-DNAs und 100µg Heringssperma-DNA (10mg Heringssperma-DNA von Sigma wurden in 1ml H₂O_{steril} gelöst und durch Erhitzen bei 100°C für 20 min in Einzelstrang-DNA aufgeschmolzen) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Pro Ansatz wurden 100µl kompetente Hefezellen und 600µl aus Stammlösungen frisch angesetzte, sterile PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40% PEG 4000, 1x TE, 1x LiAc, aus Stammlösungen: 50% PEG 4000 in H₂O, 10x TE, 10x LiAc) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 30°C und 200 rpm wurden 70µl DMSO zugefügt. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert (10 s bei 14000 x g), der Überstand verworfen und das Sediment in 250µl 1x TE resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Hefeklonen wurde der Transformationsansatz auf Leucin- und/oder Tryptophan-SD-Mangelplatten verteilt und für 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Nur Klone, die erfolgreich mit dem bzw. den Plasmid(en) transformiert worden waren, waren in der Lage auf den SD-Selektionsplatten zu wachsen, da sie durch die Plasmide befähigt wurden, ihren Auxotrophiemangel zu kompensieren.

β-Galaktosidase-Assay

Wenn das in den Hefen exprimierte Aktivierungsdomänen-Fusionsprotein mit dem DNA-Bindungsdomänen-Fusionsprotein interagiert, kommt es zur Wiederherstellung eines funktionellen Transkriptionsaktivators und die Expression des lacZ-Reportergens wird aktiviert. Die Aktivität des gebildeten Enzyms β-Galaktosidase wird in einem Filter-Assay nachgewiesen, bei dem sich Kolonien, die das Enzym enthalten, durch den Umsatz von X-Gal blau färben.

Die auf Platten gewachsenen Hefekolonien wurden auf ein Filterpapier (602 H, Ø 84 mm, Schleicher & Schuell, Daßel) übertragen und ihre Zellwände durch kurzzeitiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die derart behandelten Filter wurden auf Z-Puffer/X-Gal-getränkte Filterpapiere gelegt (Z-Puffer/X-Gal: 100 ml Z-Puffer, 0,27 ml β-Mercaptoethanol, 1,67 ml X-Gal-Stammlösung; Z-Puffer: 16,1g Na₂HPO₄ x 7H₂O, 5,5g Na₂HPO₄ x H₂O, 0,75g KCl, 0,246g MgSO₄ x 7 H₂O auf 1000ml mit Wasser; X-Gal-Stammlösung: 20mg X-Gal auf 1ml N,N-Dimethylformamid) und für bis zu 8 Stunden bei 30°C inkubiert.

Eine Blaufärbung der Klone in beiden Hefestämmen nach 1 bis 8 Stunden zeigt eine Interaktion zweier Proteine im „Yeast-two-hybrid-system“ an. Eine spätere Blaufärbung wurde als nicht positive Interaktion bewertet.

Kontrollen

Die Vitalität der Hefezellen nach Erzeugung ihrer Kompetenz und nach der Transformation mit Plasmiden wurde gezeigt, indem ihre Wachstumsfähigkeit auf Vollmedium überprüft wurde. Die Funktionalität des β -Galaktosidase-Assays wurde durch Expression eines intakten Transkriptionsaktivators und durch Positiv-Kontrollen interagierender Proteine im Hefesystem nachgewiesen.

2.1.13 *In vitro*-Translation von Proteinen

Mit dem „TNT Coupled Reticulocyte Lysate System“ von Promega (Heidelberg) konnten Plasmid-cDNAs in einem Schritt in einem zellfreien, eukaryontischen System in mRNAs transkribiert und in radioaktiv markierte Proteine translatiert werden. Als Translations-Vorlage diente die für ein Protein codierende DNA in dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 (siehe .1.5.), der den T7-Promotor enthält.

In vitro-Translationsansatz: 25 μ l Reticulocytenlysat
2 μ l Reaktionspuffer
1 μ l T7-Polymerase
1 μ l Aminosäure-Mix ohne Methionin (1 mM)
1 μ l RNAsin (40 U/ μ l, Promega)
1 μ g Plasmid-DNA (T7-Promoter)
1 μ l 35 S-Methionin (10 mCi/ml)
Endvolumen 50 μ l
Das Gemisch wurde bei 30°C für 90 min inkubiert

Zur Überprüfung der *In vitro*-Translation wurden 5 bis 10% des Ansatzes im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die translatierten Proteine autoradiographisch nachgewiesen.

2.2. Biochemische Methoden

2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür das Glycin-SDS-Gel-system nach Laemmli (1970) angewendet. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit Probenpuffer (5-fach: 167mM Tris-HCl pH 8,8; 4,2mM EDTA, 830mM Saccharose, 3,3% (w/v) SDS, 8mM DTE, Bromphenolblau) versetzt und 10 min zur Denaturierung auf 95°C erhitzt. Es wurden diskontinuierliche Gele mit 7,5% bis 12,5% (w/v) Polyacrylamid mit folgenden Maßen verwendet: 5 x 8 x 0,1cm (Länge x Breite x Stärke). Die Auftrennung erfolgte bei 80–120V und anschließend wurden die Gele entweder fixiert und gefärbt (15% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,025% (w/v) Coomassie Blau; danach zur Verdeutlichung der Proteinbanden entfärbt in 12,5% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig) oder für einen Immunoblot entsprechend in Transferpuffer äquilibriert (siehe folgendes Kapitel). Als Größenstandards dienten die in Tabelle II.3. aufgeführten „low molecular weight marker“ (LMW) und „high molecular weight marker“ (HMW) der Firma Sigma.

Tab.II.3.: Größenstandards für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

LMW	kDa	HMW	kDa
Rinderserum-Albumin	66	Myosin	200
Ovalbumin	45	β-Galaktosidase	116
GAP-DH	36	Phosphorylase B	98
Carboanhydrase	29	Rinderserum-Albumin	66
Trypsinogen	24	Ovalbumin	45
Trypsin-Inhibitor	20	Carboanhydrase	29
α-Lactalbumin	14,2		

2.2.2. Immunblot von Proteinen

Der Immunblot dient der Identifizierung von auf einer Träger-Membran immobilisierten Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Im allgemeinen werden die Proteine dazu vorher im Polyacrylamidgel aufgetrennt und dann auf eine Membran übertragen.

Als Trägermaterial wurde Nitrocellulose (Schleicher und Schuell, Daßel) verwendet. Zum Transfer der Proteine nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die elektrische Ladung der SDS-denaturierten Proteine genutzt (Elektro-Blot). Die Gele wurden in Transferpuffer (25mM Tris-HCl pH 8,3, 192mM Glycin, 15% (v/v) Methanol) äquilibriert, 6 Blatt Whatman-Papier und 1 Blatt Nitrocellulose wurden mit Transferpuffer getränkt und der Blot folgendermaßen in einer „Semidry“-Blot-Apparatur geschichtet: Anode - 3 Blatt Whatman – Trägermembran – Gel – 3 Blatt Whatman – Kathode (dabei hatten Membran und Filter exakt die gleiche Größe wie das Gel, um Seitenströme zu verhindern). Der Transfer erfolgte bei $2,5\text{mA}/\text{cm}^2$ für 60–120min.

Die Protein-Übertragung wurde durch reversible Färbung der Membran mit verdünnter Ponceau-Rot-Lösung überprüft. Die folgenden Schritte wurden in PBS-Lösungen durchgeführt. Zunächst wurden freie Bindungskapazitäten mit 5% (w/v) Milchpulver für mindestens 45 min bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in PBS für 1 Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4°C. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges waschen der Membran mit 0,5% (w/v) Milchpulver, 0,02% (v/v) Tween bei RT entfernt. Die Detektion des ersten Antikörpers erfolgte mit einem gegen den Fc-Teil gerichteten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurde der Blot wie oben gewaschen und mit PBS gespült.

Die Identifikation der vom Antikörper erkannten Proteine erfolgte über die Umsetzung eines Substrates durch HRP („Horse Radish Peroxidase“), wobei ein leuchtendes Produkt entsteht („enhanced chemiluminescence“ (ECL); Technik von Amersham-Pharmacia, Heidelberg, nach Anweisung des Herstellers).

2.2.3. Expression und Reinigung von rekombinanten Mausprofilin I und II

Maus-Profilin I und II wurden im *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) (siehe 1.2.) mit Hilfe des Expressionsvektors pET28a (siehe 1.5.) exprimiert.

Herstellung von Poly-L-Prolin-Sepharose

Für die Immobilisierung von Poly-L-Prolin (500mg, Molekulargewicht <10000 Da, Sigma, Deisenhofen) über reaktive primäre Aminogruppen wurde Cyanbromid-aktivierte Sepharose CL-4B (15g, Pharmacia, Upsala) verwendet. Vor der Kopplungsreaktion wurde die Sepharose in 1 mM HCl gequollen und gewaschen und anschließend in Kopplungspuffer gebracht (0,2M NaCl, 0,1M NaHCO₃, pH 9,0) und zusammen mit dem Poly-L-Prolin über Nacht bei 4°C in Kopplungspuffer unter Bewegung inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit Kopplungspuffer wurden noch freie reaktive Gruppen durch Inkubation mit dem gleichen Volumen 1M Ethanolamin für 1 h bei RT unter Bewegung abgesättigt. Anschließend wurde dreimal im Wechsel mit je 200ml der folgenden Puffer gewaschen: Acetat-Puffer (3,6g Eisessig, 13,43g KCl, ad 600ml mit H₂O_{dest.}, pH 4,0) und Borat-Puffer (16,78g KCl, 28,6g, Di-Natrium-Tetraborat, ad 750ml mit H₂O_{dest.}, pH 8,0). Das Material wurde in 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M NaCl, 2mM NaN₃ über mehrere Monate bei 4°C gelagert.

Expression

Zur Expression rekombinanten Profilins wurden 2 l der entsprechend transformierten *E.coli*-Kultur bis zu einer OD von 0,5 in LB-Medium mit 30µg/ml Kanamycin bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Expression wurde dann durch 1mM IPTG induziert und für mindestens 5 h fortgeführt. Die durch Zentrifugation (15 min bei 8000 x g und RT) sedimentierten Bakterien wurden in 50ml kaltem Waschpuffer für poly-L-Prolin-Sepharose-Säulen (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,6, + 1:1000 Trasylol + 50µM Pefablock SC + 20mg Lysozym) (poly-L-Prolin-Sepharose-Säule von Dr. Kathrin Schlüter zur Verfügung gestellt) aufgenommen und resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Bakterien durch Einfrieren über Nacht bei -80°C gelagert werden.

Reinigung

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 30000 x g für 1h wurde der klare Überstand auf eine poly-L-Prolin-Sepharose-Säule aufgetragen und anschließend die Säule mit Waschpuffer 1 (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,6) gespült. Das Profilin wurde nach stringentem Waschen der Säule mit 2M Harnstoff in Waschpuffer mit 6 M Harnstoff in Waschpuffer eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert und die Profilin-haltigen Fraktionen vereinigt. Die Dialyse erfolgte gegen PBS mit 0,5mM DTE (MWCO 6-8000 D, 5 x gegen 2 l). Profilin wurde sterilfiltriert und bei 4°C nicht länger als 3 Wochen gelagert.

2.2.4 Affinitätspräzipitation

Aufgereinigte Proteine, im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um Profilin I und II, wurden kovalent an Sepharose gekoppelt und dazu benutzt, aus Reticulocytenlysaten Interaktionspartner zu präzipitieren.

Kopplung der Proteine an Sepharose

Die Kopplung der Proteine erfolgte im „Batch“-Verfahren:

25µl NHS-aktivierte Sepharose (10µM N-Hydroxysuccinimid-Gruppen pro ml HiTrap™ Säulenmaterial, Pharmacia, Upsala) wurde mit 300µl eiskalter 1mM HCl aktiviert und mit 13 bis 45 nmol Profilin I und II bzw. BSA als Negativ-Kontrolle in Kopplungspuffer (0,2M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH 8,3) 1 Stunde bei RT unter Bewegung inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 s bei 14000 x g wurde der Überstand für die Bestimmung der Kopplungseffizienz abgetrennt. Freie Bindungsstellen der Sepharose wurden wie folgt abgesättigt: 300µl Puffer A (0,5M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3), 300µl Puffer B (0,1M Na-Acetat, 0,5M NaCl, pH 4,0), 300µl Puffer A, 30 min Einwirkzeit bei RT, 300µl Puffer B, 300µl Puffer A, 300µl Puffer B. Das Material konnte bei 4°C in Aufbewahrungspuffer (0,05M Na₂HPO₄, 0,1% NaN₃, pH 7,0) für 1 bis 2 Tage gelagert werden.

Bestimmung der Kopplungseffizienz

Die bei der Kopplungsreaktion freigesetzten NHS-Gruppen zeigen bei 280nm eine starke Absorption. Deshalb wurden die Proteine im Überstand der Kopplungsreaktion zuerst über eine PD10-Säule (Pharmacia, Upsala) von den NHS-Gruppen abgetrennt, dann ihre Absorption bei 280nm photometrisch bestimmt und mit der Absorption der Proteinlösung vor der Kopplungsreaktion verglichen. Die daraus errechnete Kopplungseffizienz lag zwischen 80 und 100%.

***In vitro* Transkription/Translation**

Die codierenden Bereiche von wt-mDia1 und seiner Deletionsfragmente wurden in den Vektor pET28a (Novagen, Madison, Wisc.) kloniert. [³⁵S]-markierte Proteine wurden dann mit Hilfe des „TNT coupled reticulocyte lysate system“ (Promega, Heidelberg) nach Herstelleranleitung *in vitro* synthetisiert.

Affinitätspräzipitation

25µl Aliquots der *in vitro* Transkription/Translations-Ansätze wurden mit PBS verdünnt und mit 10µl konjugierter Sepharose (siehe II.2.1.4.) für 4 h bei 4°C inkubiert. Nach der Sedimentation durch Zentrifugation, wurde die Sepharose nacheinander mit PBS, PBS + 140mM NaCl und PBS + 290mM NaCl + 0,2% Triton X-100 gewaschen. Die denaturierten Proteine des ersten Überstandes bzw. der gewaschenen Pellets wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel auf Nitrocellulose geblottet und die radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine können mit Hilfe der sogenannten Autoradiographie nachgewiesen werden. Dazu wird auf den radioaktiven Blot ein Film aufgelegt (Kodak Biomax Mr-1-Film, Integra Bioscience) und über Nacht bei –80 °C inkubiert. Nach Entwicklung und Fixierung (beide Reagenzien von Kodak, GBX Entwickler und GBX Fixierer über Integra Bioscience bezogen) des Films können die durch die Radioaktivität markierten Proteinbanden als Schwärzung auf dem Film detektiert werden.

2.2.5 Coimmunpräzipitation

In situ „crosslinking“, Präzipitation und Analyse der Protein-Komplexe erfolgte mit einigen Abweichungen wie bereits beschrieben (Hüttelmaier et al., 1998; Weiss et al., 1998). HeLa und CHO Zellen (1×10^6) wurden in 100mm Zellkulturschalen kultiviert, transfiziert (siehe II.2.3.6.) und 16 h später dreimal mit PBS + 2mM $MgCl_2$ gewaschen, um danach für 30 min bei RT mit dem membranpermeablen Crosslinker dithio-bis(succinimidylpropionat) (DSP, Pierce, Sankt Augustin) inkubiert zu werden. Überschüssiger Crosslinker wurde anschließend mit 0,2M Glycin in PBS + 2mM $MgCl_2$ abgesättigt. Die Lyse der Zellen erfolgte dann in RIPA-Puffer plus Proteaseinhibitoren (50mM Tris, pH 7,2, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,25% Desoxycholat, 1mM EGTA, 150mM NaCl, 2,5mM Natriumazid, 1 μ M Pepstatin A, 80 μ M Pefabloc, 0,46 μ M Aprotinin) in dem die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Zellscrapers (Nunc) von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst, durch Pipettieren homogenisiert und bei 15000 x g bei 4°C für 10 min sedimentiert. 25 μ l eines 1:1 Gemisches aus Protein G-Sepharose und RIPA-Puffer + 2% BSA (Sigma, Deisenhofen) wurde danach hinzugegeben. Diese Ansätze wurden dann für 1 h unter Rühren bei 4°C inkubiert, um anschließend die Sepharose durch Zentrifugation (s.o.) zu entfernen und den Überstand mit 200 μ l des Antikörpers 4A6 zu versetzen, der selektiv mit dem Bipro-Tag der exprimierten Proteine interagiert. Die Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden 40 μ l 50% Protein G-Sepharose + 2% BSA für 2 h bei 4°C hinzugegeben. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit eiskaltem RIPA + Proteaseinhibitoren und einmal mit PBS gewaschen, bevor die trockene Sepharose in SDS-Probenpuffer + 10% (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen wurde, was zu einer Spaltung der Proteinkomplexe führte. Schließlich wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Immunblot (siehe II.2.2.2) analysiert.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung von Zellkulturzellen

Die Zellen wurden in DMEM + 10% FCS oder DMEM/Ham's F12 + 10% FCS bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturgefäßen der Firma Nunc (Wiesbaden-Biebrich) kultiviert. Für Immunfluoreszenz-, transiente Transfektions- und Mikroinjektionsstudien wurden die Zellen auf Deckgläschen in Plastischalen gehalten.

Passagieren von Zellen

Zum Umsetzen von Zellen in verschiedene Kulturgefäße wurde, nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS, mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 / 0,02%, Seromed, Berlin) inkubiert, bis etwa 50% der Zellen sich vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Medium gestoppt, die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in geeigneten Verdünnungen in neue Kulturgefäße überführt.

Cryokonservierung von Zellen

Zur Langzeit-Konservierung von Zellen wurden je 10⁶ Zellen /ml nach dem Passagieren in eisgekühltem Einfriermedium (DMEM bzw. DMEM/Ham's F12 + 5% (v/v) DMSO + 10% FCS) aufgenommen und für 24 h bei -80°C in 1ml-Cryoröhrchen (Nunc) eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

2.3.2. Fixieren von Zellkultur-Zellen

Für die Darstellung zellulärer Strukturen und der Lokalisation einzelner Proteine in Zellen müssen diese Strukturen so gut wie möglich fixiert werden. Außerdem müssen die Zellen zur Aufnahme von Antikörpern und Phalloidin permeabilisiert werden.

Paraformaldehyd-Fixierung und Triton-Permeabilisierung

Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen für mindestens 24 h wurde das Medium durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Fixierung erfolgt durch 20 minütige

Inkubation mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei RT. Anschließend wurde die Fixierlösung durch Waschen, wie oben beschrieben, entfernt und die Zellen mit 0,2% Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach nochmaligem Waschen (s.o.) konnte die Inkubation mit Antikörpern beginnen (siehe folgendes Kapitel).

2.3.3. Indirekte Immunfluoreszenz und Doppelfluoreszenz mit Phalloidin

Mit dieser Methode lassen sich Proteine in Zellpräparaten spezifisch und mit hoher Auflösung lichtmikroskopisch darstellen, sofern sie an Strukturen gebunden sind.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Cytoskeletts und assoziierter Strukturen wurden fixierte, permeabilisierte Zellen für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer mit den entsprechenden Antikörpern in geeigneter Verdünnung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit zweiten, gegen den Fc-Teil der ersten Antikörper gerichteten Fluorescein- oder Rhodamin-gekoppelten Antikörpern im Dunkeln, wie mit den ersten, inkubiert.

Zur Darstellung von Aktin-Filamenten wurde Fluorescein- bzw. Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin verwendet, ein Stoffwechselprodukt des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das hochspezifisch an F-Aktin bindet (Faulstich et al., 1988). Dazu wurden die Zellen in einer direkten Fluoreszenz mit einer 10 µM Phalloidin-Fluoreszenzfarbstoff-Lösung wie mit Antikörpern inkubiert.

Die simultane Darstellung verschiedener Strukturen in einer Zelle, wodurch Kollokalisierungen untersucht werden können, wird durch die Verwendung von Erstantikörpern aus verschiedenen Species ermöglicht. Mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelte Zweitantikörper dienen hierbei zur Darstellung der Erstantikörper.

Nach den Antikörper- bzw. Phalloidin-Inkubationen wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit H₂O_{dest} gewaschen und in einem Tropfen Mowiol + Bleichschutz 3 + 1 (s.u.) auf einem Objektträger eingebettet. Die Präparate wurden 24 h bei RT getrocknet und unter Verwendung geeigneter Filtersätze für Rhodamin- und Fluorescein-Färbungen am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

Mowiol: 20 g Mowiol 4-88 (Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main)
80 ml PBS
über Nacht bei RT rühren
+ 40ml Glycerin (reinst, für Fluoreszenz-Mikroskopie)
über Nacht bei RT rühren
Zentrifugation: 1 h bei 31000 x g und RT,
Überstand abnehmen und bei 4°C dunkel aufbewahren

Bleichschutz: 2,5 g n-Propylgallat
50 ml PBS
50 ml Glycerin (reinst, für Fluoreszenz-Mikroskopie)
über Nacht bei RT rühren, bei 4°C dunkel lagern

2.3.4. Mitochondrien-„Recruitment“

Zur Untersuchung der Interaktion von Maus Profilin I und mDia1 bzw. $\Delta 7$ mDia wurden $1,5 \times 10^4$ PtK2-Zellen transient mit Mom-Flag-Profilin und GFP-Fusionsproteinen von mDia1 bzw. $\Delta 7$ mDia transient transfiziert. Das Profilin lag hierbei als Fusionsprotein vor, welches durch das Flag-Tag mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich enthielt die Profilin-cDNA noch die „Mom-Anker“-Sequenz, die eine mitochondriale Lokalisation zur Folge hat. Kommt es zur Interaktion zweier Proteine, so kann eine mitochondriale Kolo-kalisation mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Die Mitochondrien werden mit Hilfe des „Mito-Trackers“ (Sigma) nachgewiesen. Dieser wird, 1:2000 eingesetzt, 30 min mit den Zellen im Inkubator bei 37°C inkubiert, da er membranpermeabel ist. Erst nach diesem Inkubationsschritt erfolgte die Fixierung der Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz.

2.3.5. Transiente und stabile Transfektion

Zellkultur-Zellen wurden durch die Calciumphosphat-Methode (HeLa und CHO) bzw. FuGene (CHO) (Boehringer Mannheim) mit eukaryontischen Expressionsvektoren transient transfiziert und exprimierten so vorübergehend das jeweilige durch das Plasmid codierte

Protein. Bei der transienten Transfektion wurde der Expressionsvektor pcDNA3-Bipro, der das Bipro-Tag enthält (Rüdiger et al., 1997), und die codierenden Regionen von mDia1 und seinem Deletionsfragment Δ 1mDia enthält, verwendet.

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wurden 2 μ g DNA/20-mm Kulturschale eingesetzt. Die Inkubation erfolgte dann für mindestens 12 h bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und nochmals für weitere 24 h inkubiert, dann fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Transiente Transfektion von CHO-Zellen für die Coimmunpräzipitation mittels FuGene erfolgte nach Herstellerangaben.

Stabile CHO-Derivate erhielt man, indem man 7×10^4 Zellen/60-mm Kulturgefäß für 24 h kultivierte und dann mittels Calciumphosphat-Methode mit 10 μ g DNA transfizierte und zwar entweder mit dem Kontrollvektor pEGFP-C2 (Clontech, Heidelberg) oder Vektoren, die für Fusionsproteine von EGFP und wt-mDia1 bzw. Δ 1mDia kodierte. Für jedes Konstrukt wurden Einzelklone in G418-haltigem Medium (GibcoBRL, Karlsruhe) selektioniert. Die Konzentration des Antibiotikums betrug hierbei 0,6mg/ml. Einzelklone wurden erhalten, indem 50 – 100 Zellen pro 100mm Nunc-Zellkulturschale ausgesät wurden, um sie nach Koloniebildung mit Hilfe von Glaszylindern (Sigma, Deisenhofen) selektiv in 24-well-Platten (Nunc) passagieren zu können.

2.3.6. „Cell-Spreading“ und „Wounding-Assay“

Die Anheftung und das Ausbreiten von CHO-Zellen und den stabilen Derivaten wurden analysiert, indem die Zellen auf Deckgläschen ausgesät wurden. Proben wurden jede Stunde nach Aussaat entnommen und fixiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Phasenkontrast-Mikroskops, indem die zelluläre Ausbreitung einer von zwei Kategorien zugeordnet wurde: flache, ausgebreitete Zellen (Gruppe 1) und kleine, abgerundete Zellen (Gruppe 2).

1×10^5 CHO-Zellen wurden in 60 mm Kulturgefäßen bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Mit einer Pipettenspitze (Breite 1 mm) wurde eine Wunde in den Zellrasen gekratzt. Zellreste wurden durch intensives Waschen mit PBS entfernt und frisches Medium, das zusätzlich 0,1 μ g/ml Colcemid enthielt (Biochrom, Berlin), wurde hinzugegeben. Das Schließen der Wunde wurde durch Photographieren der Zellen im Phasenkontrast nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h dokumentiert.

III. Ergebnisse

1. Identifizierung der Bindungsstelle von mDia1 und Profilin

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung mit Profilin durch *in vitro* Experimente bestätigt und zudem die Bindungsstelle *in vivo* näher charakterisiert werden. Dafür wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt. Die Fähigkeit des Profilins FH-Proteine zu binden wurde durch Two-Hybrid-Daten und *in vitro*-Bindungsstudien bestätigt und konnte bereits für Fliegen, Hefen und humane Proteine gezeigt werden (Evangelista et al., 1997; Imamura et al., 1997; Castrillon und Wasserman, 1994; Emmons et al., 1995; Lynch et al., 1997)

1.1. Herstellung verschiedener Deletionsmutanten zur Identifizierung der Bindungsstelle für Profilin

Abb. III.1.1 faßt nochmals die wichtigsten Eigenschaften von mDia1 zusammen.

mDia1 gehört zur Familie der Formin-homologen-Proteine, die durch spezifische Domänen charakterisiert werden. Die prolinreiche FH1-Domäne, charakterisiert durch eine Wiederholung des Motifs IP₅LPG, ist dabei ebenso zu nennen wie die stark konservierte FH2-Domäne. Eine Interaktion von mDia1 mit Profilin konnte in *in vitro* Experimenten bereits gezeigt werden (Watanabe *et al.*, 1997). Die N-terminal liegende Rho-Bindungsdomäne ist die dritte für mDia1 charakterisierte Domäne. Die kürzlich bei *Schizosaccharomyces pombe* gefundene FH3-Domäne (Petersen et al., 1998), die ebenfalls im N-terminalen Bereich liegt und sich teilweise mit der Rho-Bindungsdomäne überschneidet, weist den geringsten Homologie-Grad aller FH-Domänen auf. Ihre Funktion in mDia1 ist nicht geklärt.. Übereinstimmend mit Ergebnissen für eine Kernlokalisierung anderer Säugerformine ist die Identifizierung von drei Kernlokalisierungssignalen mit Hilfe des Programmes PSORT II. Diese Sequenzen, vom N- zum C-Terminus gehend, sind KHKKFLERFTSMRIKKEKE (bipartite), KKDQEGGEEKKSVQKKK (bipartite) und RRKR.

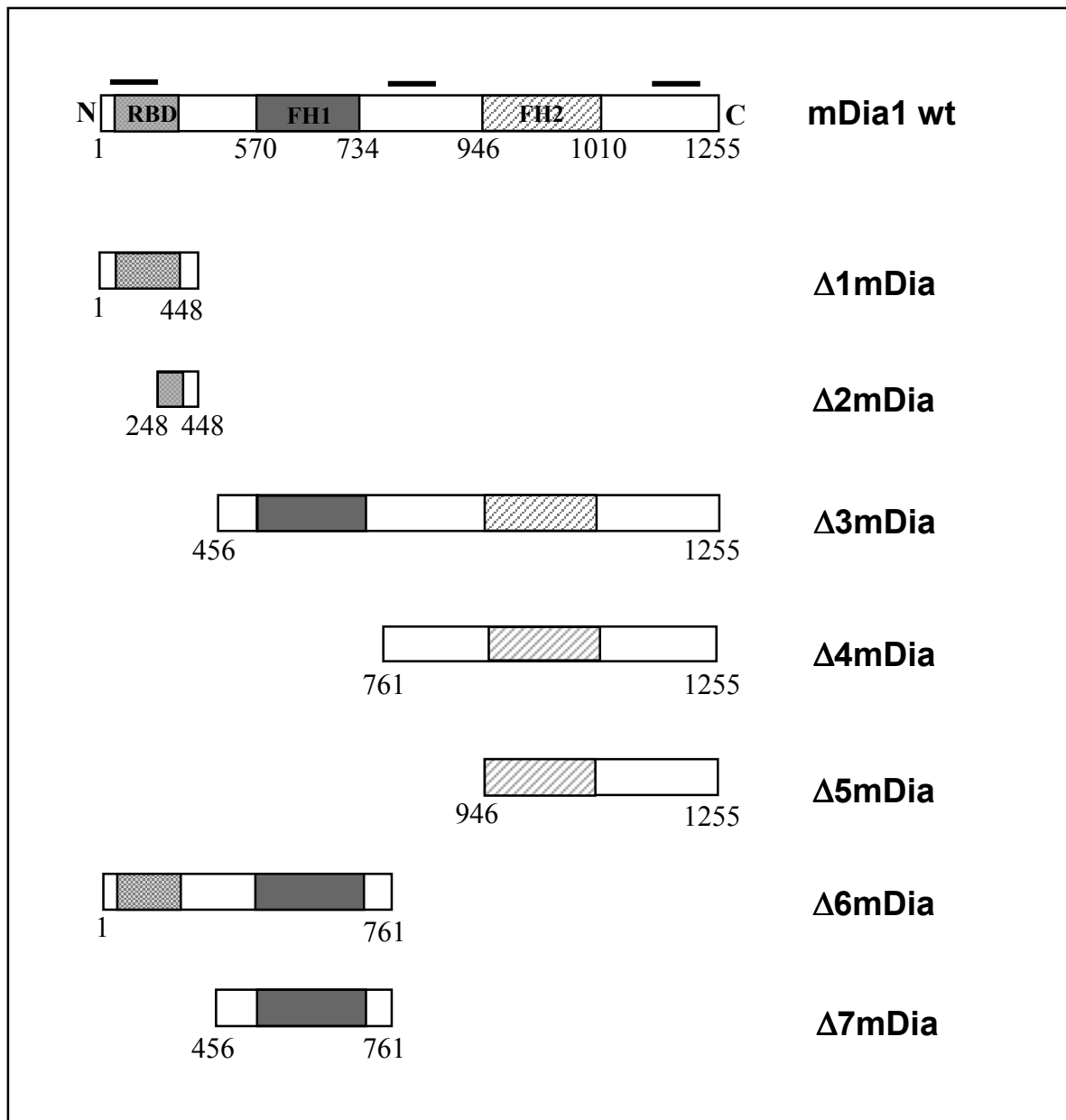


Abb. III.1.1: Molekulare Anatomie von wt-mDia1 und seiner Deletionsfragmente Δ1-Δ7mDia

RBD: Rho-Bindungsdomäne, von Aminosäure 63-240; FH1- und FH2-Domäne: Formin-Homologie-Regionen 1 und 2, Aminosäuren 570-734 (FH1) und 946-1010 (FH2). Die N- und C-terminal stehenden Zahlen geben die Länge des jeweiligen Fragmentes an. Potentielle Kernlokalisationssignale (NLS) werden durch Balken über dem wild Typ- (wt) Protein angezeigt.

Abb.III.1.1 zeigt die Deletionskonstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide hergestellt wurden (siehe II.1.6.). Bei den verwendeten Vektoren handelte es sich um pGAD424, pGBT9 (beide Clontech), pET28a (Novagen), pEGFP-C2 (Clontech) und pcDNA3-Bipro (Invitrogen, in unserem Labor modifiziert). Dazu wurden die Vektoren EcoR/SalII bzw. NdeI/SalI (nur pET28a) verdaut und die cDNA des jeweiligen mDia1-Fragmentes unter Verwendung des entsprechenden Oligonukleotids (siehe II.1.6.) in den Vektor kloniert. Die für mDia1 charakteristischen FH-Domänen sowie die Rho-

Bindungsdomäne sind eingezeichnet. Die FH3-Domäne ist nicht gezeigt, da sie im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde und eine Funktion für mDia1 bis jetzt noch nicht gezeigt werden konnte.

1.2. Charakterisierung der Interaktion von mDia1 und Profilin im „Yeast two-hybrid system“

In dem „Yeast two-hybrid system“ (Fields et al., 1994) werden die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine mit dem DNA-bindenden bzw. dem transkriptionsaktivierenden Modul des GAL4 Transkriptionsfaktors in Hefezellen exprimiert. Unter der Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors liegt das β -Galaktosidase-Gen. Interagieren die untersuchten Proteine, kommt es zur Rekonstitution des Transkriptionsfaktors und damit zur Expression des Reportergens. Das gebildete Protein läßt sich im β -Galaktosidase-Filter-Assay nachweisen. Um eine direkte Interaktion zwischen mDia1 und Profilin I und II zu testen, wurde dieser experimentelle Ansatz verwendet. Dazu wurden geeignete Vektoren, die die cDNAs von Mausprofilin I und II, mDia1 sowie seiner Deletionsfragmente enthielten, verwendet. Mausprofilin I und II wurden in *S.cerevisiae* als DNA-Bindungsdomänen-Fusionsproteine exprimiert, während die mDia1-Deletionskonstrukte mit dem transkriptionsaktivierenden Modul gekoppelt waren.

Im „Yeast two-hybrid system“ wurde reproduzierbar gezeigt, daß die Klone $\Delta 3$ mDia und $\Delta 7$ mDia mit Mausprofilin I und II interagieren. Durch Verwendung des die FH1-Domäne enthaltenden $\Delta 7$ mDia-Fragmentes zeigte sich, daß die Region, welche das poly-L-Prolin-Motiv enthält, für die Bindung der Profile an mDia1 verantwortlich ist. Entgegen den Erwartungen zeigten das wt-Protein und die $\Delta 6$ mDia-Mutante kein positives Ergebnis, was unter anderem auf eine sterische Behinderung innerhalb der Hefezellen zurückzuführen sein könnte. Unter Berücksichtigung der Bindungseigenschaften der Profile ist somit anzunehmen, daß die Wechselwirkung zwischen mDia1 und Profilin über die prolinreiche Aminosäuresequenz vermittelt wird. Der Nachweis der mDia1-Profilin-Interaktion gelang dabei nur, wenn die mDia-Konstrukte mit der transkriptionsaktivierenden Domäne und Profilin mit der DNA-bindenden Domäne fusioniert waren.

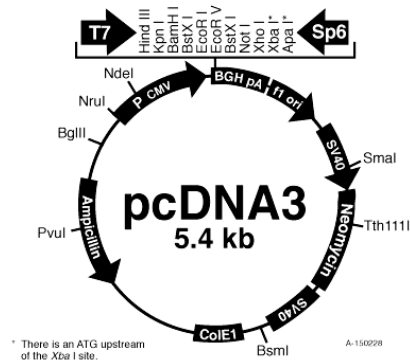
Tabelle III.1: Ergebnisse der „Yeast two-hybrid“-Untersuchungen zur mDia1-Profilin-Wechselwirkung

	pGBT9/Profilin I	pGBT9/Profilin II
pGAD424/mDia1	-	-
pGAD424/Δ1mDia	-	-
pGAD424/Δ3mDia	+	+
pGAD424/Δ4mDia	-	-
pGAD424/Δ5mDia	-	-
pGAD424/Δ6mDia	-	-
pGAD424/Δ7mDia	+	+

Ergebnisse der „Yeast two-hybrid“-Untersuchungen zur Interaktion von mDia1 und seiner Deletionsfragmente mit den Mausprofilin-Isoformen I und II. (-) keine Interaktion, (+) Interaktion

1.3. Mitochondrien Targeting von mDia1 und Δ 7mDia durch Maus-Profilin I

Als zellbiologischer Nachweis der Interaktion von Profilin und mDia1-Fragmenten, die die prolinreiche FH1-Domäne beinhalten, wurde der experimentelle Ansatz der Mitochondrien-rekrutierung durch cotransfizierte Proteine verwendet. Hierzu wurden PtK2-Zellen transient mit Profilin I- und mDia1-Konstrukten transfiziert. Das Profilin war hierbei durch den mitochondrialen Mom-Anker (siehe II.2.3.4) mit diesen Zellorganellen verbunden. Kommt es nun zur Interaktion zwischen dem Profilin und mDia1 bzw. Δ 7mDia, so werden diese beiden Proteine durch das Profilin an die Mitochondrien rekrutiert, wenn die Affinität zum Profilin höher ist, als zu anderen möglichen Wechselwirkungspartnern. Die daraus resultierende Kolokalisation kann dann mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Abbildung III.1.2 zeigt den verwendeten pcDNA3-Vektor (Invitrogen) mit der dazugehörigen Sequenz für das Birkenprofilin-Tag.



Birkenprofilin-Tag

5'-AGC TTC CTT CCC ACA GTT TAA GCC TCA GGA AAT CTA GC-3'

3'-AG GAA GGG TGT CAA ATT CGG AGT CCT TTA GAT CGA GCT-5'

Das Tag wurde in die KpnI und EcoRI Schnittstellen des Vektors kloniert. Proteine wurden C-terminal zum Tag kloniert

Abb.III.1.2: Vektorkarte und Sequenz des verwendeten Birkenprofilin-Tags

Wie man erkennt, rekrutiert das Profilin beide mDia1-Konstrukte an die Mitochondrien. Ohne gleichzeitige Co-Transfektion von, mit dem Mom-Anker fusionierten Profilin, zeigen beide mDia-Konstrukte eine cytoplasmatische Verteilung ohne mitochondriale Lokalisation. Liegen jedoch Profilin und mDia-Fragment in der Zelle vor, so ist eindeutig eine Kolo-kalisation an diesen Zellorganellen erkennbar. Die prolinreiche FH1-Domäne ist demnach für die Interaktion von Profilin und mDia1 bzw. $\Delta 7mDia$ *in vivo* verantwortlich und für die Wechselwirkung essentiell.

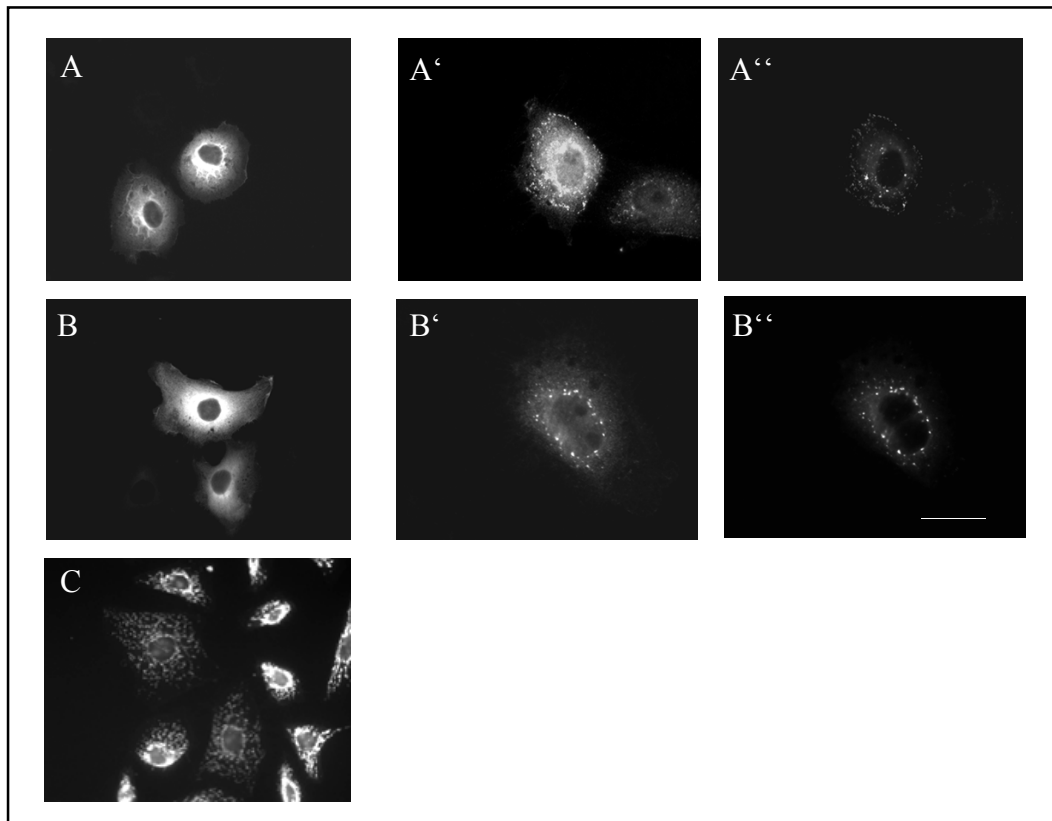


Abb. III.1.3: Mitochondriale Rekrutierung von EGFP-mDia1 und EGFP-Δ7mDia durch Mom/Flag-Profilin

EGFP-mDia1 (A, A') und EGFP-Δ7mDia (B, B') werden aufgrund ihrer Interaktion mit dem Profilin durch Mom/Flag-Profilin (A', B') an die Mitochondrien rekrutiert und kolokalisieren dort. Der Nachweis der transfizierten mDia1-Proteine erfolgte über EGFP-Fluoreszenz und der des cotransfizierten Profilins mit Hilfe des Flag-Tag Antikörpers (Sigma). (C) zeigt die Mitochondrien-Anfärbung durch den Mito-Trackers (Sigma).

Maßstab: 10µm

1.4. Affinitätspräzipitation von mDia1-Fragmenten mit Profilin-Sephrose

Zur Verifizierung der mDia1-Profilin-Interaktion *in vitro*, sowie seiner Deletionsfragmente wurde als weitere Methode die Affinitätspräzipitation eingesetzt. Der Nachweis einer spezifischen Wechselwirkung beruht bei diesem experimentellen Ansatz auf einer Copräzipitation der aufgrund ihrer Affinität miteinander interagierenden Proteine. Es handelt sich hierbei um eine Abwandlung der Affinitätssäulenchromatographie. Ein Protein wird an Sepharose gekoppelt und im „Batch“-Verfahren zu einer Proteinlösung gegeben, in der der mögliche Bindungspartner radioaktiv markiert vorliegt. Ist das markierte Protein nach Abtrennung der Sepharose-Ligand Perlen von der Lösung durch Zentrifugation im Sediment, läßt dies auf eine spezifische Interaktion zwischen den rekombinanten Proteinen schließen.

Gereinigtes, rekombinantes Mausprofilin I und II wurde, wie unter II.2.2.3 beschrieben, an Sepharose B 4 Fast Flow gekoppelt. mDia1 und seine Deletionsfragmente als mögliche Interaktionspartner wurden durch *in vitro*-Transkription/Translation synthetisiert (vgl. II.2.1.13). Die hierbei erhaltenen Proteinmengen sind sehr gering, so daß die Menge an gekoppelten Profilin ausreichend für eine Präzipitation ist. Verwendet wurden je Affinitätspräzipitationsansatz 50µl des *in-vitro* Translatats, welches später durch das eingebaute, [³⁵S]-markierte Methionin autoradiographisch nachgewiesen wurde. Nach der Präzipitation der aufgrund ihrer Affinität miteinander interagierenden Proteine, wurden Proben des Pellets und des Überstandes durch SDS-PAGE (siehe II.2.2.1.) aufgetrennt und mittels Semi-Dry-Blot (siehe II.2.2.2.) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte über Autoradiographie (siehe II.2.2.4).

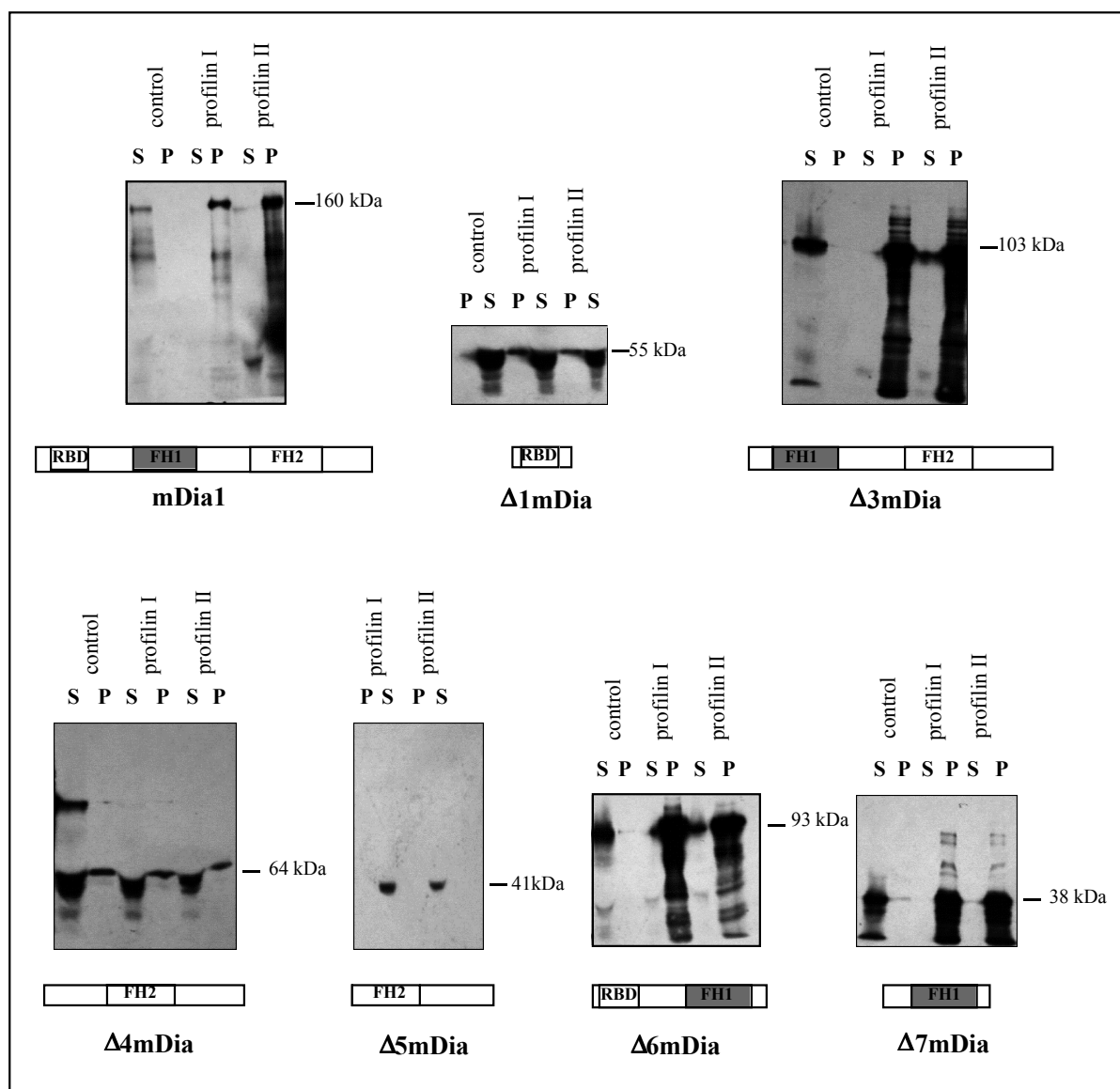


Abb. III.1.4: Autoradiogramm der Affinitätspräzipitation von *in vitro* translatierten mDia-Proteinen durch die Profilin-Isoformen I und II.

An NHS-HiTrap gekoppeltes Profilin I und II wurden zusammen mit *in vitro* translatierten [³⁵S]-markierten mDia-Proteinen inkubiert und Überstand (S, Supernatant) sowie Pellet (P) anschließend durch Zentrifugation und SDS-PAGE getrennt. Nach einem Blot erfolgte der autoradiographische Nachweis. Kontrolle: BSA an NHS-HiTrap gekoppelt.

Wie man in Figur III.1.4 erkennt, konnten alle Fragmente, welche die poly-L-Prolin-reiche FH1-Domäne enthalten, durch die Profilin-Sepharose sedimentiert werden, wobei das $\Delta 7$ mDia-Fragment, welches hauptsächlich aus dieser Domäne besteht, ebenfalls noch an beide Profilin-Isoformen band. Kein Protein, welches diese Domäne nicht enthielt, konnte durch die Profilin-Sepharose sedimentiert werden. Die Negativkontrollen zeigen keine Bindung von mDia1 und seiner Fragmente an die Sepharose allein, so daß die Wechselwirkung auf eine direkte Interaktion von Profilin und mDia1 bzw. $\Delta 7$ mDia zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Interaktion von mDia1 mit beiden Profilin-Isoformen durch die prolinreiche FH1-Domäne vermittelt wird.

1.5. Immunpräzipitation aus Zellen von mDia1 und seiner Deletionsfragmente nach *in situ* crosslinking

Um die Daten aus dem „Yeast two-hybrid-system“ und der Affinitätspräzipitation *in vivo* zu bestätigen, wurden Hela-Zellen transient mit der cDNA von wt-mDia1, $\Delta 1$ mDia und $\Delta 7$ mDia transfiziert. Als eukaryontisches Expressionssystem diente der pcDNA3-Vektor (siehe II.1.5.). Die Proteine lagen dabei als Fusionsprotein mit dem Birkenprofilin-Tag (vgl. II. 1.6) vor, welches selektiv durch den 4A6-Antikörper (Rüdiger et al., 1997) erkannt wird. Dieser Antikörper erkennt keine Säuger-Profiline, sondern ausschließlich Profileine aus der Familie der Birken (Wiedemann et al., 1996). Um die Protein-Komplexe noch in der lebenden Zelle, also *in situ*, zu stabilisieren, wurden sie vor der Lyse der Zellen mit dem membran-durchgängigen „crosslinker“ DSP behandelt (Hüttelmaier et al., 1998; Weiss et al., 1998). Die Immunpräzipitation der Zell-Lysate fand dann mittels des anti-Birkenprofilin-Antikörpers (4A6) und Protein G-Sepharose, welche Immunglobuline der Klasse G spezifisch bindet, statt. Die Präzipitate wurden anschließend sedimentiert, gewaschen und mit Hilfe der SDS-PAGE im Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und Profilin mit Hilfe des 2H11-Antikörpers (siehe II.1.8.) detektiert.

Das Ergebnis dieses Experimentes bestätigt die Hypothese, daß die Interaktion von mDia1 und Profilin über die FH1-Domäne vermittelt wird, durch *in vivo* Daten. Sowohl das wt-

Protein, als auch das $\Delta 7$ mDia-Fragment, waren in der Lage, Profilin zu präzipitieren, während die Rho-Bindungsdomäne des $\Delta 1$ mDia-Fragmentes dies nicht vermochte. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, daß mDia1 und Profilin in der Zelle über die poly-L-Prolin-reiche FH1-Domäne miteinander wechselwirken.

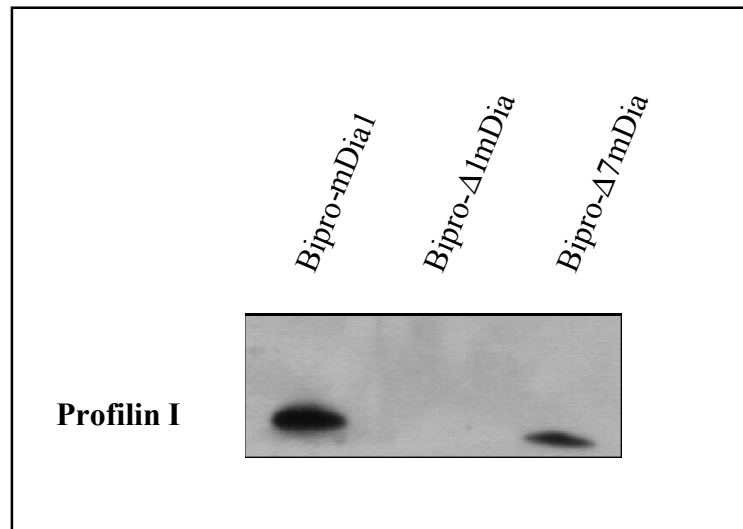


Abb. III.1.5: Coimmunpräzipitation von wt-mDia1, $\Delta 1$ mDia und $\Delta 7$ mDia aus dem Rohextrakt von HeLa-Zellen durch Profilin I.

HeLa-Zellen wurden vor der Lyse mit dem Membran-permeablen Crosslinker DSP behandelt, Bipro-markierte mDia1-Proteine wurden mit Hilfe des 4A6-Antikörpers präzipitiert und die Proteinkomplexe anschließend zentrifugiert und eine SDS-PAGE sowie ein Immunblot durchgeführt. Die Anwesenheit von Profilin im Pellet wurde durch den Antikörper 2H11 detektiert, der spezifisch mit Säugerprofilinen reagiert.

2. Herstellung stabil exprimierender Zell-Linien von mDia1 und seines Deletionsfragmentes $\Delta 1$ mDia

Um die Effekte verschiedener mDia1-Domänen auf die Motilität von Zellen zu untersuchen, wurden CHO-Zellen stabil mit wt-mDia1 und $\Delta 1$ mDia transfiziert. Die cDNA dieser Proteine lag hierfür als Fusionsprotein mit EGFP (Green fluorescent protein, variant E) vor. Der leere Vektor diente dabei in den verschiedenen Experimenten als Kontrolle.

Zur Subklonierung der mDia1-cDNA sowie der $\Delta 1$ mDia-cDNA wurden die kodierenden Bereiche aus dem Vektor pGAD424 als EcoRI/SalI-Fragmente herausgeschnitten und in den mit denselben Enzymen verdauten Vektor pEGFP-C2 kloniert. Stabil exprimierende Zellklone konnten dann mittels Geneticin-haltigem Medium selektioniert, mit Hilfe von Klonierungszyklindern vereinzelt und dann weiter kultiviert werden. Zell-Linien mit dem korrekten Phänotyp konnte mit einem Fluoreszenzmikroskop, nach Anregung des EGFP-Fusionsanteils, direkt nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Expression der gewünschten Proteine im Western Blot mit Hilfe eines anti EGFP-Antikörpers (Clontech) nachgewiesen. Die durch ECL sichtbar gemachten Proteinbanden sollten dann das korrekte Molekulargewicht von EGFP bzw. den EGFP-mDia-Fusionsproteinen ergeben.

Die stabil exprimierten EGFP-mDia-Fusionsproteine (vgl. Abb. III.2.1) zeigten nach ECL-Entwicklung im Blot das korrekte Molekulargewicht, es wurde spezifisch nur eine Bande vom Antikörper erkannt, so daß es sich tatsächlich um die transfizierten Proteine handeln muß. Die Fluoreszenz der stabil transfizierten CHO-Zellen zeigt neben der cytoplasmatischen auch eine nukleäre Verteilung der EGFP-Fusionsproteine. Da dies aber auch für den Kontrollvektor, also den leeren pEGFP-C2, zutraf, ist die Kernlokalisation wahrscheinlich nicht auf die in mDia1 enthaltenen Kernlokalisationssequenzen zurückzuführen (vgl. Abb. III.2.1). Bei der Herstellung stabil exprimierender Zellklone von verschiedenen mDia1-Fragmenten stellte sich ferner heraus, daß die stabile Expression von $\Delta 2$ mDia- und $\Delta 7$ mDia-Proteinen letal für die Zelle ist. Mit diesen beiden Proteinen stabil transfizierte CHO-Zellen exprimierten diese zwar noch eine Zeit lang, konnten aber nicht mehr passagiert werden. Nach der Überführung der Zellen in neue Zellkulturgefäße, konnte sich diese stabilen Transfektanten nicht mehr am Substrat anheften.

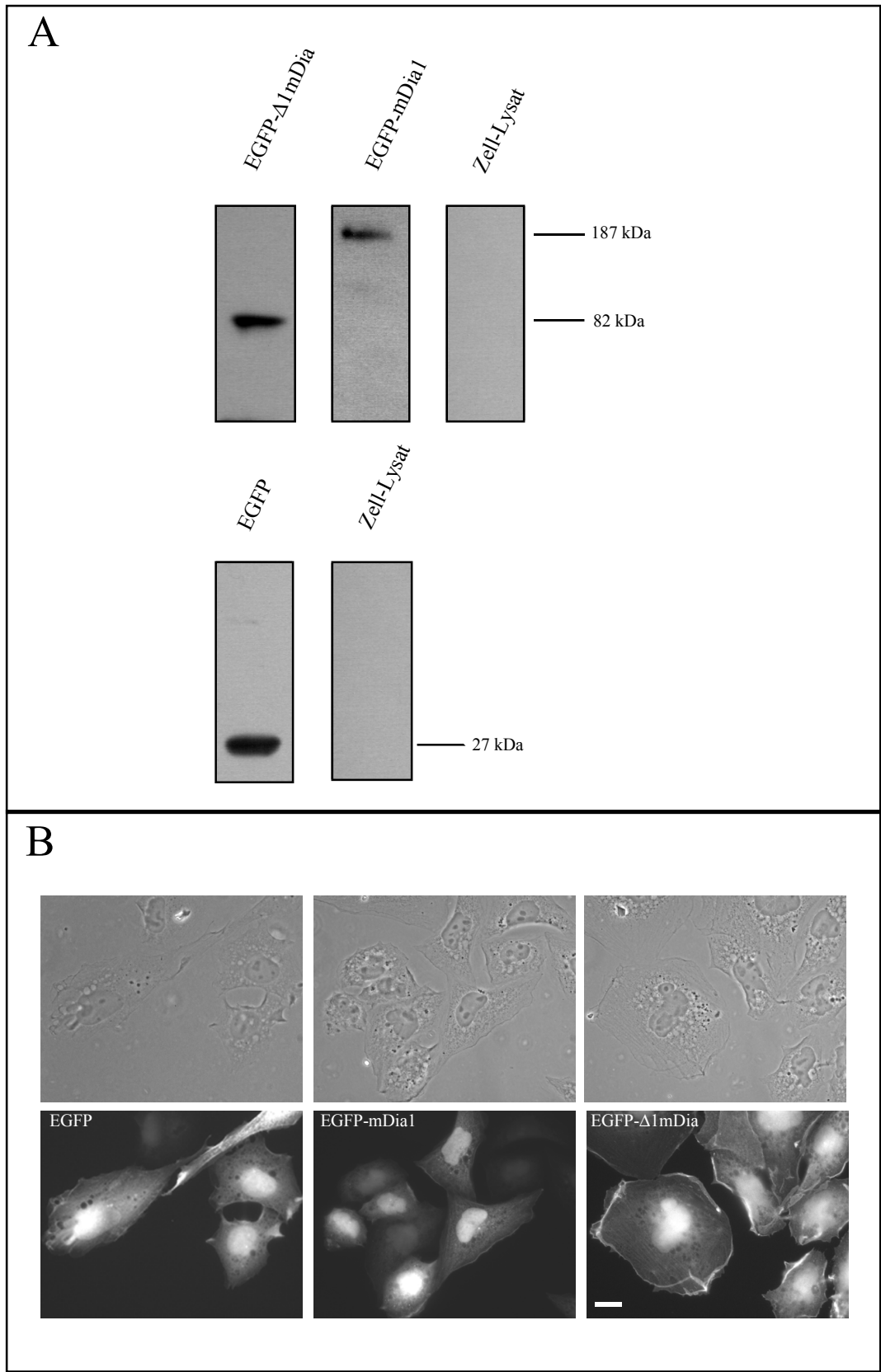


Abb. III.2.1: Expression von EGFP, EGFP-mDia1 und EGFP-Δ1mDia in stabil transfizierten CHO-Zellen.

(A): Immunblots aus Zell-Lysaten nach SDS-PAGE mit Hilfe eines anti-EGFP-Antikörpers. Selektive Reaktion des Antikörpers mit den EGFP-Fusionsproteinen zeigt das korrekte Molekulargewicht.

Kontrolle: Zell-Lysat nicht-transfizierter CHO-Zellen.

(B): Phasen-Kontrast-Aufnahmen und EGFP-Fluoreszenz der stabilen CHO-Zell-Linien zum Nachweis der Expression.

Maßstab: 10µm.

2.1. Das stabil exprimierte Δ1mDia-Protein verstärkt die Zellanheftung und die Zellausbreitung

Bei der Zellanheftung und der Zellausbreitung werden neue Zell-Matrix-Kontakte gebildet. Während dieser Vorgänge kommt es zu einer Reifung der Anheftungsstellen von fokalen Komplexen hin zu fokalen Kontakten (Rottner et al., 1999). Dieser Übergang wird unter anderem von den kleinen GTPasen der Rho-Familie beeinflusst (Rottner et al., 1999). Da mDia1 als Bindungsglied zwischen der Signaltransduktionskaskade und dem Aktin-Cytoskelett wirkt, wurde das Verhalten der stabil transfizierten CHO-Zellen bei der Zellanheftung sowie der Zell-Lokomotion (siehe Abb.III.2.3) näher charakterisiert.

EGFP-, EGFP-mDia1 und EGFP-Δ1mDia stabil exprimierende Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, nach definierten Zeiträumen fixiert und im Phasen-Kontrast analysiert. Zur Auswertung wurden die Zellen in zwei unterschiedliche Kategorien eingeteilt: 1. flach ausgebreitete Zellen und 2. kleine, abgerundete Zellen, die sich noch nicht ausgebreitet hatten. Zur Quantifizierung wurden etwa 200 Zellen pro Ansatz gezählt.

Wie man in Abbildung III.2.2. erkennt, breiteten sich die Kontrollzellen, die nur EGFP exprimieren, relativ langsam aus. Nach 5 Stunden war die Anzahl an runden, kompakten Zellen noch ungefähr doppelt so hoch, als die von ausgebreiteten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten die EGFP-mDia1 exprimierenden CHO-Zellen eine höhere Anzahl an Kategorie 2 Zellen. Zum gleichen Zeitpunkt waren etwa ebenso viele Zellen bereits vollständig ausgebreitet, wie kleine, kompakte, nicht vollständig abgesetzte Zellen, vorhanden waren. Diese Tendenz wurden vom letzten, stabil exprimierenden Zellklon sogar noch übertroffen. Bei dieser Kultur hatten sich nach 5 Stunden bereits mehr Zellen vollständig ausgebreitet, als wie sich absetzten. Desweiteren war erkennbar, daß bei diesem Zellklon, der die Rho-Bindungsdomäne von mDia1 exprimiert, zu jedem Zeitpunkt mehr Zellen vollständig ausgebreitet waren, als bei den anderen beiden Kulturen.

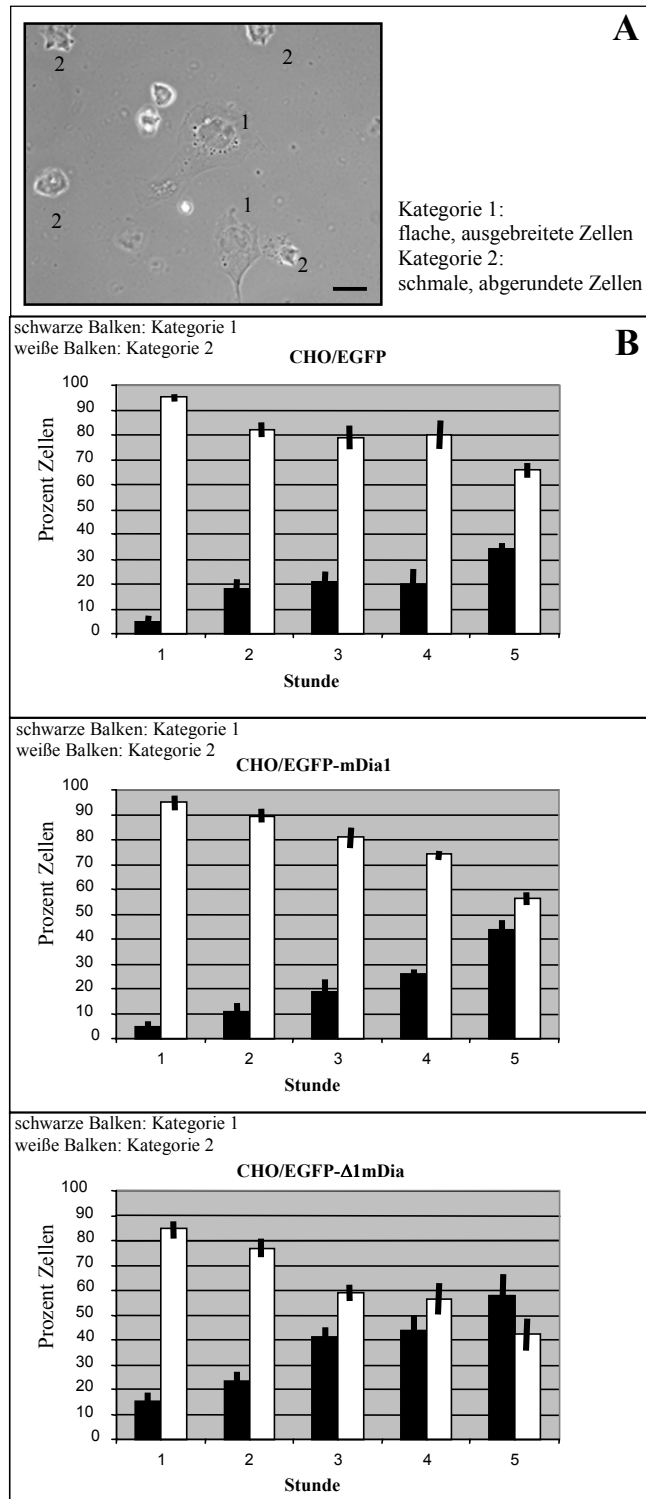


Abb. III.2.2.: Quantitative Analyse der Zellausbreitung bei stabil exprimierenden CHO-Zellen.

Stabil EGFP (Kontrolle), EGFP-mDia1 und EGFP-ΔImDia exprimierende Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, Proben nach 1h – 5h genommen und die Zellen anschließend fixiert.

(A): Phasen-Kontrast-Aufnahme zur Zuordnung der Zellen zu einer von zwei Kategorien: flache, ausgebreitete Zellen (Kategorie 1) und kleine, abgerundete, noch nicht ausgebreitete Zellen (Kategorie 2).

Maßstab: 10µm.

(B): quantitative Analyse der Zellen im Hinblick auf ihre Zuordnung zu einer der beiden Kategorien, dargestellt in Form von Balkendiagrammen. Mindestens 200 Zellen in 4 unabhängigen Experimenten wurden pro Deckglas ausgezählt. Standardabweichungen sind durch Balken angezeigt.

2.2.Verminderung der lokomotorischen Aktivität durch die Rho-Bindungsdomäne

Zelluläre Bewegung ist ebenfalls ein Effekt der durch die GTPasen der Rho-Familie, also Cdc42, Rac und Rho, vermittelt und beeinflusst wird (Nobes und Hall, 1999; Lauffenburger et al., 1996), deshalb wurde die lokomotorische Aktivität der stabilen Transfektanten in einem geeigneten Testsystem näher charakterisiert.

Die Motilität der drei stabil exprimierenden Zell-Linien wurde in einem „Wounding Assay“ experimentell untersucht. Dazu wurde mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze eine Wunde in einen konfluenten Zellmonolayer gekratzt und so lange mit PBS gewaschen, bis dieser Bereich nicht durch im Medium schwimmende Zellen besetzt werden konnte. Die Wundheilung wurde mittels Photographie dokumentiert. Dieser Vorgang wurde als das Ergebnis zellulärer Motilität interpretiert, da die Zellproliferation durch das Cytotoxin Colcemid inhibiert wurde (siehe Abb. III.2.3).

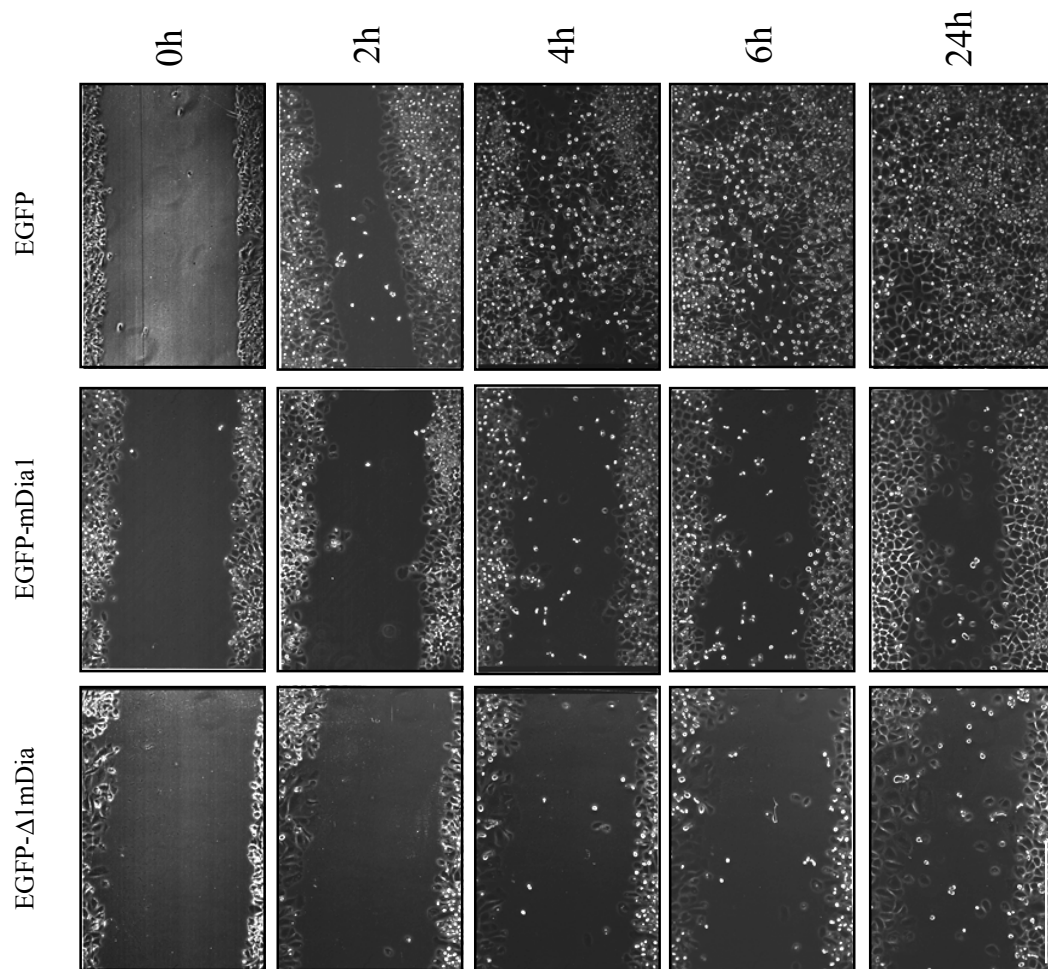


Abb. III.2.3.: Lokomotorische Aktivität stabil EGFP, EGFP-mDia1 und EGFP-Δ1mDia exprimierender Zellen.

Eine Wunde wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze in eine konfluente Zellkultur gezogen. Die Kulturen wurden zu bestimmten Zeitpunkten im Phasen-Kontrast photographiert, um die Wundheilung zu dokumentieren. Maßstab: 1mm

Wie man in Abbildung III.2.3. erkennt, zeigen CHO-Zellen, die EGFP-mDia1 bzw. EGFP-Δ1mDia stabil exprimieren, eine Verlangsamung ihrer lokomotorischen Aktivität. Die Wundheilung war bei ihnen im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen stark vermindert. Offensichtlich war ihre Motilität durch die Expression der mDia-Proteine verlangsamt. Selbst nach 24 h war die gezogene Wunde immer noch deutlich erkennbar, während sie bei den Kontrollzellen nach 6 h fast geschlossen war.

2.3. Überexpression der Rho-Bindungsdomäne von mDia1 bewirkt extensives Ruffling in CHO-Zellen

Tierische Zellen bewegen sich durch Kriechen auf einer Matrix. Die treibende Kraft für diese Bewegung kommt hauptsächlich durch den koordinierten Auf- und Abbau des Aktinfilamentsystems. Die kleinen GTPasen der Rho-Familie regulieren dabei die Organisation der Aktin-Filamente (Nobes und Hall, 1999). Das Ausbilden der sogenannten Führungslamelle am vorderen Zellpol ist hierbei phänotypisch charakteristisch. Zelluläre Lokomotion wurde bereits in der Einleitung genauer beschrieben. Prominente Strukturen wurden dabei extra hervorgehoben (vgl. Seite 2-4).

Deswegen wurde zelluläre Motilität im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht, indem man das dynamische Membranverhalten der CHO-Klone näher charakterisierte. Dazu betrachtete man die EGFP-mDia1 und EGFP- Δ 1mDia-Zell-Linien in der Immunfluoreszenz und quantifizierte ruffelnde Zellen durch Auszählen. Dafür wurden circa 300 Zellen pro Deckglas in 4 verschiedenen Versuchen ausgezählt.

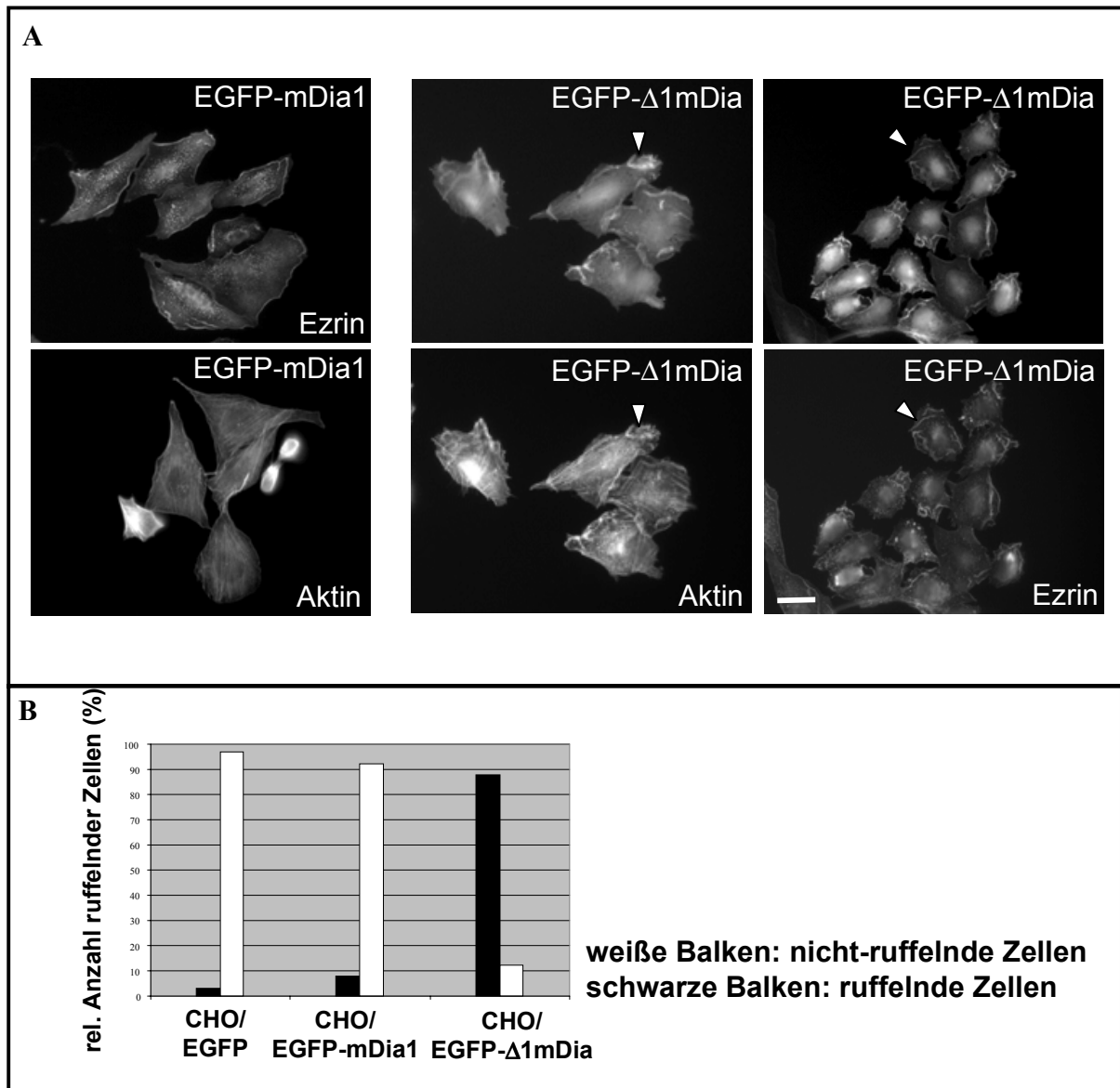


Abb. III.2.4: Membran-Dynamik stabil exprimierender EGFP-mDia1 und EGFP-Δ1mDia CHO-Zellen.

(A): Extensive Ruffling-Aktivitäten bei EGFP-Δ1mDia exprimierenden Zellen im Gegensatz zur EGFP-mDia1 Zell-Linie. Kolokalisation der EGFP-Fusionsproteine mit F-Aktin (Phalloidin-TRITC markiert) und Ezrin (Nachweis über anti-Ezrin Antikörper). Pfeilspitzen weisen auf Bereiche starker Membrandynamik hin.

(B): Quantitative Analyse der relativen Anzahl an ruffelnden Zellen in stabilen CHO Zell-Linien von EGFP (Kontrolle), EGFP-mDia1 und EGFP-Δ1mDia. Maßstab: 10μm

Wie man in Abbildung III.2.4 erkennt, weisen Zellen, die das wt-Protein stabil exprimieren, eine vollständig ausgebreitete Erscheinungsform mit wenigen dynamischen Membranbereichen auf. Das F-Aktin liegt hauptsächlich in der Form von Stressfasern vor und ein Marker für dynamische Membranbereiche, Ezrin, zeigt größtenteils eine cytoplasmatische Verteilung, ebenso wie EGFP-mDia1. Die relative Anzahl an ruffelnden Zellen korreliert mit der der Kontroll-Kultur, die nur den leeren Vektor besitzt, also EGFP alleine exprimiert. Im

Gegensatz dazu zeigen EGFP- Δ 1mDia exprimierende Zellen eine wesentlich höhere Membrandynamik. Diese Zell-Linie weist neben EGFP- Δ 1mDia auch das Protein Ezrin, welches als Marker für Ruffles gilt (Bretscher et al., 1991), in den dynamischen Membranbereichen auf. Ebenso erkennt man eine Kolo-kalisation mit dem Aktin-Netzwerk dieser Regionen. Der dramatische Anstieg an ruffelnden Zellen wurde ebenfalls nach der Quantifizierung von Zellen mit dynamischen Membranabschnitten deutlich. Etwa 90% aller Zellen zeigen diesen Phänotyp.

2.4. Analyse der stabilen Transfektanten mittels Immunfluoreszenz

Wie bereits gezeigt werden konnte, weisen stabil Δ 1mDia exprimierende Zellen eine hohe Membrandynamik auf, die phänotypisch dem zellulären Ruffling (vgl. Seite 2) entsprechen. Ob man von echten „Ruffles“ sprechen kann sollte mit Hilfe von Proteinen geklärt werden, die in Bereichen verstärkter Membranbewegungen zu finden sind. Als wichtigster Marker gilt hierbei das Ezrin (Bretscher et al., 1991 und 1997), dessen Kolo-kalisation sich bereits im vorherigen Versuch nachweisen ließ (vgl. III.2.4).

Die zelluläre Lokalisation unterschiedlicher Proteine, die als Marker für Ruffles gelten sowie den kleinen GTPasen Rac und Rho, wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (siehe II.2.3.3) bestimmt. Die Lokalisation dieser Markerproteine wurde dann mit der subzellulären Verteilung von EGFP- Δ 1mDia gekoppelten Proteinen verglichen.

Wie man in Abbildung III.2.5 erkennt, weisen die Proteine Aktin, Profilin, Ezrin, RhoA und Rac1 eine Kolo-kalisation mit der Rho-Bindungsdomäne des Δ 1mDia-Proteins in dynamischen Membranbereichen auf, während man bei dem wt-Protein mDia1 bzw. bei den Kontroll-Zellen, welche nur den leeren Vektor exprimieren, lediglich eine cytoplasmatische Verteilung erkennen kann. Da das Δ 1mDia-Protein mit den als Ruffle-Marker geltenden Proteinen in diesen dynamischen Membranabschnitten kolokalisiert, können diese Bereiche als echte Ruffles definiert werden.

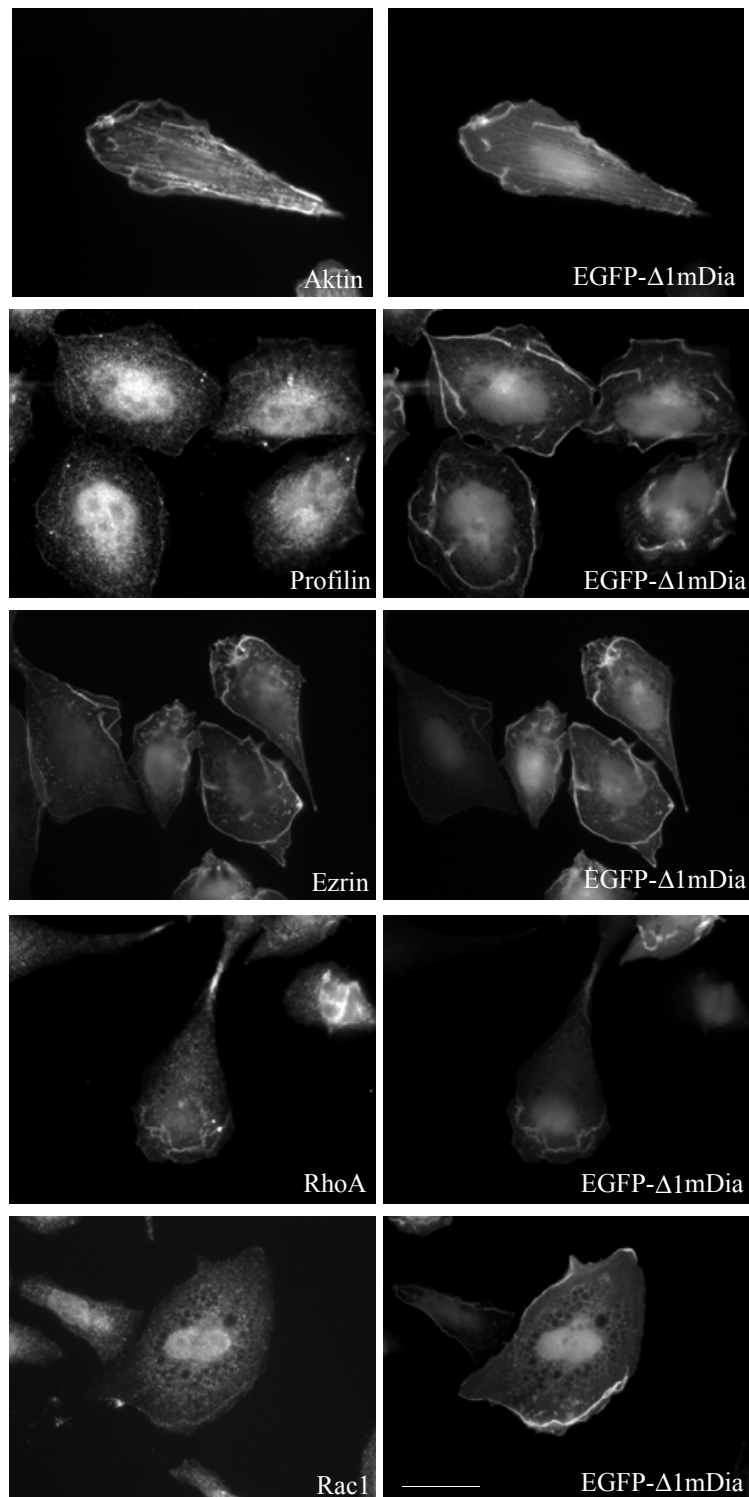


Abb. III.2.5: Doppel-Fluoreszenz-Analyse von EGFP-Δ1mDia und cytoskelettalen Proteinen bzw. den kleinen GTPasen.

F-Aktin wurde mit Hilfe von TRITC-Phalloidin, Profilin, Ezrin, RhoA und Rac1 durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht.

Maßstab: 10µm

2.5. Inhibition des durch das $\Delta 1mDia$ -induzierten Rufflings durch dominant negatives Rac1

Die Umstände des durch die Rho-Bindungsdomäne verursachten Ruffling sollten im folgenden näher charakterisiert werden. Es ist bekannt, das Rho unter anderem in Maus-Fibroblasten für die Bildung von Streßfasern und fokalen Kontakten verantwortlich ist, während Rac die Bildung dynamischer Membranbereiche an der Zellperipherie und kleinerer, fokaler Komplexe bewirkt (Rottner et al., 1999; Ridley und Hall, 1992). Um eine Beteiligung von Rac an den durch $\Delta 1mDia$ induzierten Ruffles nachzuweisen, wurde stabil EGFP- $\Delta 1mDia$ exprimierende CHO-Zellen mit dominant negativem Rac (N17Rac1) supertransfiziert und dann mittels Immunfluoreszenz und Quantifizierung dynamischer Membranbereiche aufweisender Zellen, analysiert.

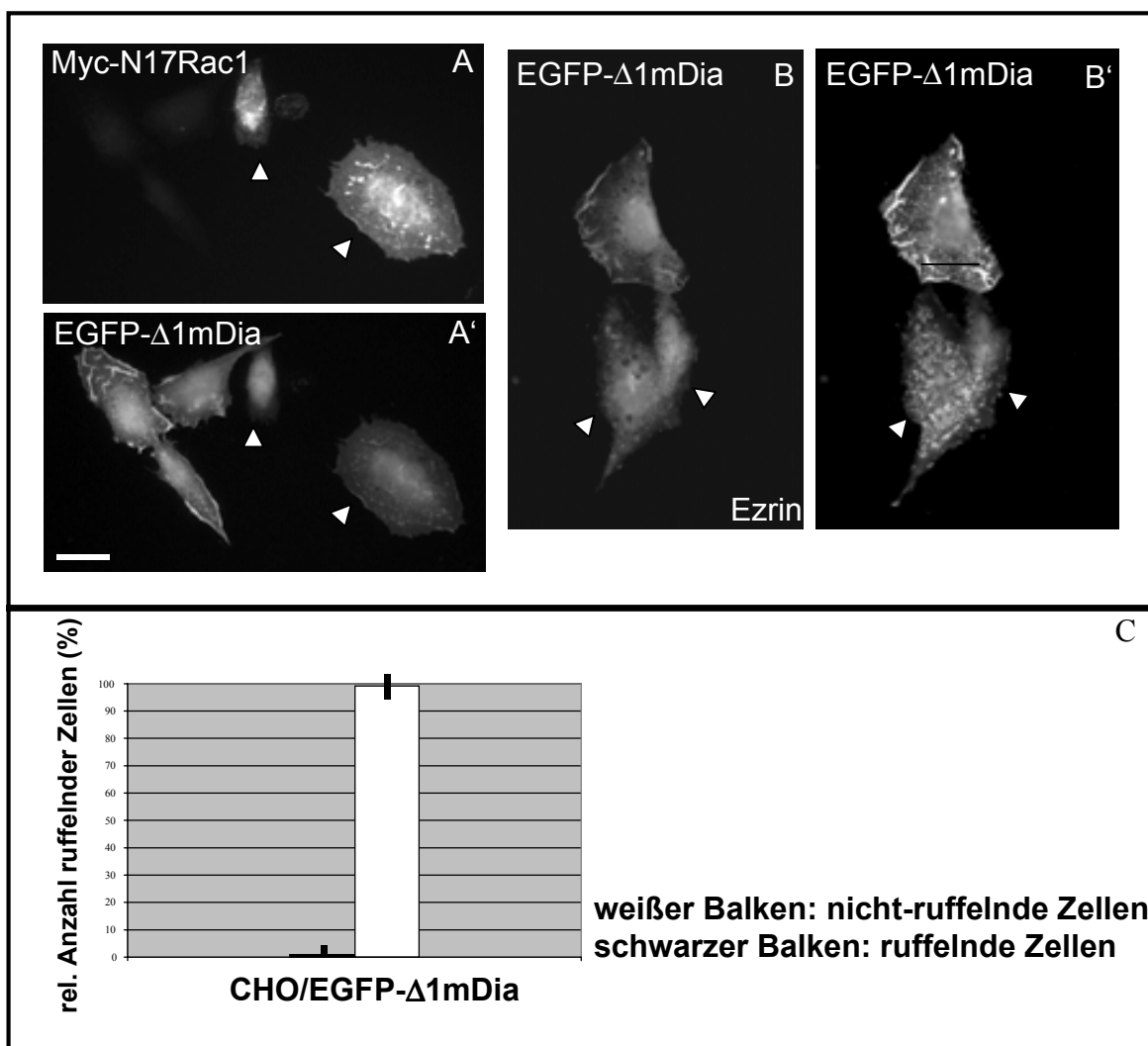


Abb. III.2.6: Supertransfektion stabil $\Delta 1mDia$ exprimierender Zellen mit dominant negativem Rac1 (N17Rac1).

(A, A'): Doppel-Fluoreszenz-Analyse mit Hilfe eines anti Myc-Tag-Antikörpers zum Nachweis dominant negativen Rac1 (A) und EGFP Fluoreszenz (A'). Supertransfizierte Zellen sind durch Pfeilspitzen indiziert.

(B, B'): Dreifach-Fluoreszenz mit Antikörpern gegen Ezrin (B), Myc-Tag markiertes Rac1 und EGFP-Fluoreszenz (B'). Supertransfizierte Zellen, die myc-markiertes N17Rac1 exprimieren wurden über einen AMCA-gekoppelten Zweitantikörper identifiziert, dessen Signal zwar mit bloßem Auge detektiert werden kann, aber nicht zu photographieren ist, deshalb können diese Aufnahmen nicht gezeigt werden. Die entsprechenden Zellen werden jedoch durch Pfeilspitzen angezeigt. Maßstab: 10 μ m.

(C): Quantifizierung der Ruffling-Aktivität von $\Delta 1mDia$ -exprimierenden Zellen nach Supertransfektion mit N17Rac1. Mindestens 300 Zellen wurden in 4 unabhängigen Versuchen ausgezählt.

Wie man in Abbildung III.2.6 erkennt, konnte der starke Ruffling-Effekt durch die Expression dominant negativen Rac1 fast vollständig inhibiert werden. Nahezu 100% der quantitativ charakterisierten Zellen wiesen nach Supertransfektion von N17Rac1 keine dynamischen Membranbereiche mehr auf.

Gleichzeitig änderte sich ebenfalls die subzelluläre Lokalisation von EGFP- $\Delta 1mDia$ und des Ruffle-Markers Ezrin. Weisen beide Proteine bei der nicht-supertransfizierten Kontrolle eine Kolokalisation in den dynamischen Membranabschnitten auf, so liegt nach Expression des dominant negativen Rac1 ausschließlich eine cytoplasmatische Verteilung beider Proteine vor, wobei das $\Delta 1mDia$ -Protein innerhalb von Spots im Cytoplasma verteilt zu sein scheint.

Dadurch konnte eine Beteiligung der kleinen GTPase Rac1 an dem durch das $\Delta 1mDia$ -Protein induziertem Ruffling-Effekt vor, da es bei Anwesenheit der dominant negativen Form dieser kleinen GTPase der Rho-Familie zu einem Verschwinden des Ruffling-Phänotypes kommt.

2.6. Das $\Delta 1mDia$ -Protein interagiert *in vivo* ausschließlich mit Nager mDia1

Nachdem eine Beteiligung der kleinen GTPase Rac am Ruffling-Effekt klar gezeigt werden konnte, sollte in einem abschließenden Versuch geklärt werden, ob $\Delta 1mDia$ direkt mit zellulärem mDia1 und/oder RhoA interagiert und diese Wechselwirkung den Ruffling-Effekt bewirkt. Eine direkte Interaktion des stabil exprimierten Proteins mit endogenem mDia1 würde die Hypothese unterstützen, daß mDia1 eine intramolekulare Interaktion zwischen N- und C-Terminus aufweist (Watanabe et al., 1999). Ein durch GTP-Rho aktiviertes, also geöffnetes Protein, ist in der Lage, die Signaltransduktionskaskade fortzuführen und Effekte in HeLa-Zellen zu vermitteln. Die intramolekulare Interaktion von mDia1 mit sich selbst beruht auf einer Wechselwirkung von N- und C-Terminus, wobei die letzten 39 C-terminalen Aminosäuren essentiell für die Bindung sind. Die Frage, die sich nun stellte, war die, ob das N-terminale $\Delta 1mDia$ -Fragment ebenfalls in der Lage sein würde, mit dem C-Terminus zu

interagieren und die intramolekulare Bindung aufzubrechen. Da die japanische Arbeitsgruppe mit der humanen HeLa-Zell-Linie gearbeitet hat (Watanabe et al. 1999) wurde diese Zellen ebenfalls in diesem experimentellen Ansatz verwendet. In diesem Zusammenhang wurde auch eine mögliche, gleichzeitige Interaktion mit zellulärem Rho näher charakterisiert. Um dies alles zu klären, wurde auf den experimentellen Ansatz der Coimmunpräzipitation zurückgegriffen (siehe II.2.2.5).

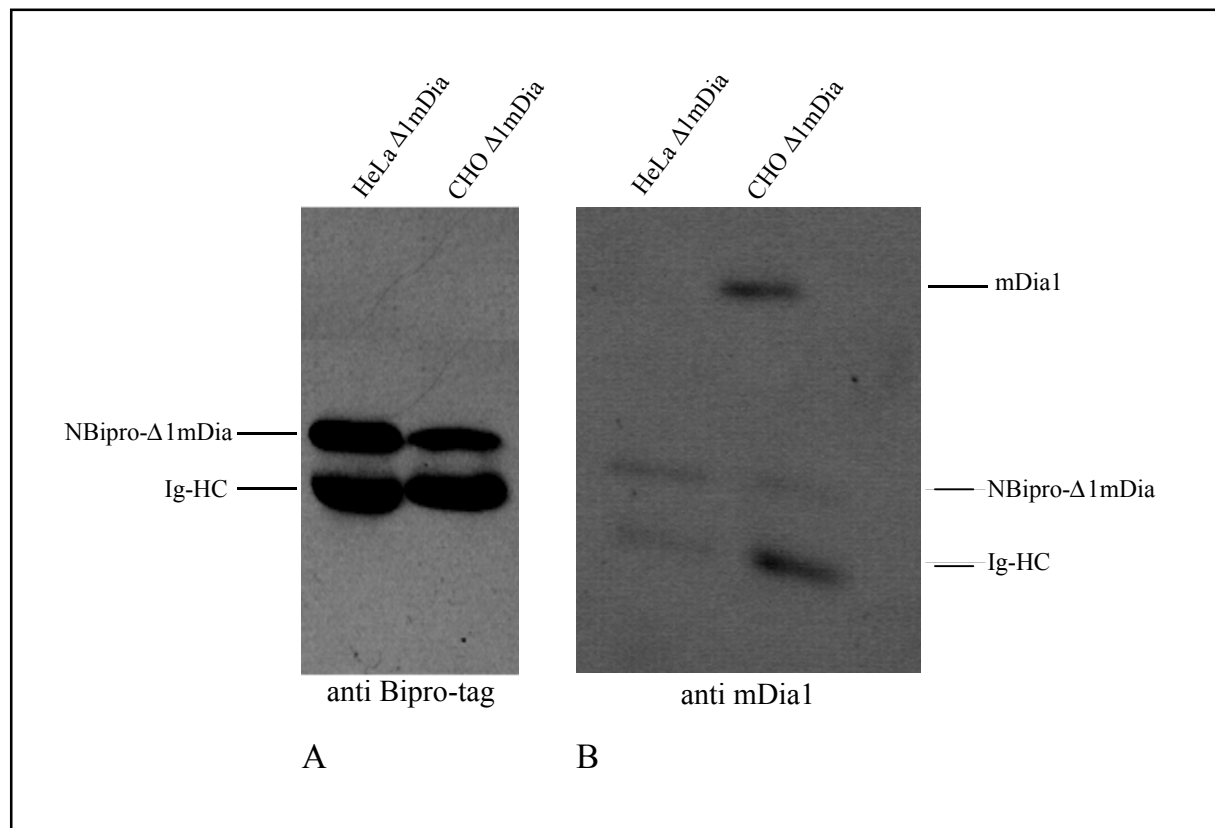


Abb.III.2.7: Coimmunpräzipitation von endogenem mDia1 durch Δ1mDia aus Zell-Lysaten von CHO und HeLa-Zellen.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit dem membran-permeablen Crosslinker DSP behandelt und Proteinkomplexe mit Hilfe des anti Birkenprofilin-Antikörpers 4A6 präzipitiert. Nach SDS-PAGE erfolgte der Nachweis transient exprimierten Δ1mDia-Proteina und endogenem mDia1 über spezifische Antikörper. Ig-HC: Schwere („heavy“)-Antikörper-Kette

Das Ergebnis dieses Versuches (siehe Abb. III.2.7) war überraschend. Δ1mDia ist *in vivo* nur in der Lage mit Nager mDia1 zu interagieren, nicht aber mit der humanen Isoform aus HeLa-Zellen. Keinerlei Interaktion konnte mit zellulärem Rho nachgewiesen werden, egal ob human oder Nager.

Dieses Ergebnis weist auf eine direkte Interaktion der Rho-Bindungsdomäne mit zellulärem mDia1 hin, möglicherweise kommt es zu einem Aufbrechen der intramolekularen Interaktion.

Eine unmittelbare Wechselwirkung von Rho und $\Delta 1mDia$ mit Hilfe des experimentellen Ansatzes der Immunpräzipitation konnte nicht gezeigt werden, obwohl dieses Fragment die vollständige Rho-Bindungsdomäne enthält (vgl. III.1.1). Dieses Testsystem ist für Interaktionsstudien mit den kleinen GTPasen jedoch nur bedingt geeignet (S. Narumiya, persönliche Mitteilung).

IV. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindungsstelle zwischen Profilin und dem Formin-verwandten Protein mDia1 charakterisiert. Die Interaktion beider Proteine konnte durch *in vivo*-Daten bestätigt werden. Dazu wurden verschiedene Deletionsmutanten des mDia1 Proteins hergestellt. Dabei ergab sich, daß ein N-terminales Fragment für die Ausbildung von Ruffles verantwortlich war. Dieses Phänomen wurde anschließend durch *in vitro* und *in vivo* Experimente näher charakterisiert.

1. Kartierung der Bindungsstelle von Profilin und mDia1 *in vivo*

Profilin ist ein bedeutendes Protein des Mikrofilamentsystems an der Nahtstelle zwischen dem Cytoskelett und der Signaltransduktion. Seine Funktionsweise ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Liganden dieses Proteins bekannt, deren Anzahl jedoch in den darauffolgenden Jahren stetig anstieg. Einer dieser Liganden ist mDia1, für das *in vitro* eine Wechselwirkung mit Profilin gezeigt werden konnte (Watanabe et al., 1997). Dieses Protein gehört zur Familie der Formin-verwandten Proteine, die durch zwei FH-Domänen gekennzeichnet sind. Die prolinreiche FH1-Domäne scheint hierbei die Interaktion mit dem Profilin zu vermitteln, da dieses Protein über eine poly-L-Prolin-Bindungsstelle verfügt und eine Interaktion mit dem „Vasodilator Stimulated Protein“ (VASP) über genau dieses Motiv bereits gezeigt werden konnte (Reinhard et al., 1995). Für andere Formin-verwandte Proteine konnte ebenfalls schon eine Interaktion mit Profilin nachgewiesen werden. So zeigen die *S. cerevisiae* Proteine Bni1p und Bnr1p ebenfalls eine Wechselwirkung mit Profilin *in vivo*, die über die FH1-Domäne vermittelt wird (Evangelista et al., 1997; Imamura et al., 1997). Beide Proteine sind an der Zellteilung und der Ausbildung der Zellpolarität in Hefen beteiligt (Zahner et al., 1996; Jansen et al., 1996; Evangelista et al., 1997; Imamura et al., 1997). Ein weiteres Protein, diesmal jedoch aus der Spaltheefe *S. pombe*, weist ebenfalls eine Interaktion mit Profilin auf. Cdc12p, welches bei der Cytokinese eine Rolle spielt, interagiert mit Profilin, was durch *in vitro* Experimente gezeigt werden konnte (Chang et al., 1997). Auch für die *Drosophila melanogaster* Proteine Cappuccino und Dia konnte eine Bindung an Profilin nachgewiesen werden (Castrillon und Wasserman, 1994; Emmons et al., 1995; Manseau et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese, daß die Interaktion zwischen mDial1 und Profilin *in vivo* über dessen Prolin-Motiv erfolgt bestätigt. Dazu wurden verschiedene Deletions-Fragmente des mDial1-Proteins hergestellt. Charakteristisch für diese Proteine war die An- bzw. Abwesenheit einer oder mehrerer der drei bis jetzt für mDial1 charakterisierten Domänen.

Die bereits bekannte direkte Interaktion zwischen mDial1 und Profilin *in vitro* wurde durch *in vitro* translatiertes mDial1 und seiner Deletionsfragmente, sowie durch rekombinant hergestelltes Profilin mit Hilfe der Affinitätspräzipitation am Beginn dieser Arbeit nochmals bestätigt. Eine mögliche Bindungsstelle konnte *in vitro* dadurch bereits eingegrenzt werden, da hier neben dem intakten Protein auch seine Deletionsfragmente charakterisiert wurden. Während dieses Experimentes zeigte sich, daß die prolinreiche FH1-Domäne des Formin-verwandten Proteins tatsächlich die Wechselwirkung zu vermitteln scheint. Alle Proteine, die diese Domäne beinhalten, zeigen in diesem experimentellen Ansatz *in vitro* eine Interaktion mit den beiden Isoformen des Profilins. Das kürzeste Deletionsfragment, welches fast ausschließlich aus der FH1-Domäne besteht, zeigt hierbei noch Interaktion mit Profilin. Für diese Wechselwirkung ist demnach die Anwesenheit der prolinreichen FH1-Domäne essentiell und ausreichend. Keinerlei Unterschied konnte in bezug auf eine geänderte Wechselwirkung im Hinblick auf die Profilin-Isoformen festgestellt werden. mDial1 und seine Deletionsfragmente interagieren mit Profilin I und II gleich. Da der experimentelle Ansatz der Affinitätspräzipitation jedoch nur qualitative Rückschlüsse auf die Wechselwirkung erlaubt, kann über eine unterschiedliche Affinität des mDial1-Proteins für eine der beiden Isoformen keine Aussage gemacht werden. Das Säuger Profilin II, also die Isoform die hauptsächlich im Gehirn und in neuronalen Zellen exprimiert wird (Giesemann et al., 1999; Witke et al., 1998), ist bekannt dafür, daß sie eine höhere Affinität zu prolinreichen Sequenzen besitzt als Profilin I (Lambrechts et al., 1997), wie sie ebenfalls in VASP (Reinhard et al., 1995) und SMN (Giesemann et al., 1999) vorkommen. Die beiden letztgenannten Proteine sind ebenfalls Profilin-Liganden für die eine Interaktion *in vivo* nachgewiesen werden konnte, die aber nicht zur Familie der Formin-verwandten Proteine gehören.

Eine Bestätigung der *in vitro* Daten durch *in vivo* Experimente erfolgte dann mit Hilfe des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems. Dieser experimentelle Ansatz ist eine elegante Methode die Interaktion zweier Proteine unter physiologischen Bedingungen zu überprüfen. Er beruht auf

einer möglichen räumlichen Trennung der beiden Domänen des eukaryontischen Transkriptionsaktivators GAL4. Durch Konstruktion von Hybridplasmiden, die entweder für die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsaktivators und ein Protein X kodieren bzw. für die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsaktivators und ein Protein Y, kommt es nach Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression von Fusionsproteinen. Interagieren die Proteine X und Y miteinander, so kommt es zur räumlichen Annäherung der DNA-Bindungsdomäne und des transkriptionsaktivierenden Bereiches des Transkriptionsaktivators und dadurch zu einem rekonstituierten, funktionsfähigem Protein. Dies bewirkt wiederum die Transkription eines Reportergens, was mit Hilfe eines Nachweisverfahrens, dem sogenannten β -Galaktosidase-Assay, überprüft werden kann (Übersichtsartikel von Fritz und Green, 1992; Fields und Sternglanz, 1994).

Für Interaktionsstudien von Proteinen im „Two-Hybrid“-System gibt es allerdings bestimmte Einschränkungen. Proteine, die eine eigene Transkriptionsaktivator-domäne besitzen, können in diesem experimentellen Ansatz nicht eingesetzt werden, da sie selbst schon die Transkription des Reportergens induzieren würden. Gleiches gilt für Proteine mit ausgeprägten sauren Regionen (Ma und Ptashne, 1987). Zudem muß die Interaktion im Zellkern stattfinden. Der Transport der Fusionsproteine in den Kern der Hefezellen erfolgt über Kernlokalisationssignale in den Fusionsanteilen des Transkriptionsaktivators. Extrazelluläre Proteine oder solche mit dominanten, intrazellulären Lokalisationssignalen, wie z.B. Membran-assoziierte Proteine, sind demnach für Interaktionsstudien in diesem Ansatz ebenfalls nur bedingt geeignet (Fritz und Green, 1992; Fields und Sternglanz, 1994). Außerdem muß ausgeschlossen werden, daß eine festgestellte Wechselwirkung auf der Interaktion des Proteins mit dem Fusionsanteil des Aktivators beruht. Weitere Einschränkungen ergeben sich durch die Expression der Proteine als Fusionsanteile mit einer Domäne des GAL4-Transkriptionsaktivators. Dadurch kann die Konformation des Proteins verändert werden oder Bindungsdomänen können verdeckt sein. Daher ist mit dem „Two-Hybrid“-System nur dann eine Aussage über die Interaktion zweier Proteine möglich, wenn eine Wechselwirkung positiv nachgewiesen werden kann. Der Umkehrschluß, daß keine Interaktion vorliegt, wenn mit Hilfe des Reportergens keine detektiert werden konnte, ist nicht zulässig.

Deswegen kann als Ergebnis des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten „Two-Hybrid“-Experimentes lediglich die Aussage getroffen werden, daß eine Interaktion mit Profilin nur für die Fragmente $\Delta 3mDia$ und $\Delta 7mDia$, welches fast ausschließlich aus der prolinreichen FH1-Domäne besteht, nachgewiesen werden konnte. Ein positiver Nachweis für die anderen

Deletionsfragmente bzw. das wt-Protein, welche ebenfalls über den FH-Anteil verfügen, kann an einem der oben aufgeführten Einschränkungen dieses experimentellen Ansatzes gescheitert sein. Festzuhalten bleibt jedoch, daß die Interaktion von Profilin mit der prolinreichen Region des mDia1-Proteins in einem ersten Experiment auch *in vivo* gezeigt werden konnte.

Zum weiteren Nachweis der mDia1-Profilin Interaktion *in vivo* wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Bei diesem Experiment wurden HeLa-Zellen transient mit Bipro-markierten mDia-Fragmenten transfiziert. Kommt es zur Bildung von Protein-Protein-Komplexen in der Zelle, können diese anschließend noch in den Zellysaten *in situ* durch DSP vernetzt bleiben und anschließend die Profilin-mDia-Komplexe über einen spezifischen Antikörper, der gegen den Tag gerichtet ist, immunpräzipitiert werden. Der Nachweis des co-immunpräzipitierten Profilins erfolgt dann im Western Blot. Auch hier zeigte sich, daß nur die beiden die FH1-Domäne enthaltenden Fragmente, nämlich das wt-Protein und das $\Delta 7$ mDia-Fragment, in der Lage waren, Profilin zu komplexieren. Das ausschließlich den N-Terminus und die Rho-Bindungsdomäne enthaltende $\Delta 1$ mDia-Protein war nicht in der Lage Profilin zu immunpräzipitieren. Für eine Interaktion unter physiologischen Bedingungen ist demnach die prolinreiche FH1-Domäne ausreichend.

Als letzter Nachweis für eine Wechselwirkung von Profilin und mDia1 wurde das sogenannte „Mitochondrien-Recruitment“ durchgeführt (Methode nach M. Rüdiger, Kaufman et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Hierbei werden PtK2-Zellen transient mit Profilin und mDia-Fragmenten doppel-transfiziert. Das Profilin wurde dabei mit dem sogenannten Mitochondrien-Anker fusioniert, der eine Lokalisation des ansonsten cytoplasmatischen Proteins an eben diesem Zellorganell bewirkt. Der Nachweis des an die Mitochondrien gebundenen Profilins erfolgt anschließend über indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines Antikörpers. Der hierbei verwendete Antikörper erkennt dabei ein Tag, welches neben dem Mitochondrien-Anker ebenfalls mit dem Profilin fusioniert wurde. Die mDia-Proteine liegen in diesem Experiment als Fusionsprodukte des EGFP-Proteins vor, welches durch seine Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Kommt es nun zur Interaktion der Proteine, erhält man eine Kolokalisation beider ansonsten cytoplasmatischen Proteine an den Mitochondrien. Auch in diesem experimentellen Ansatz konnten die *in vitro*-Daten *in vivo* bestätigt werden. Profilin und mDia interagieren nur bei Anwesenheit der FH1-Domäne miteinander.

Durch diese Ergebnisse wird die essentielle Rolle dieses Abschnittes, der 14 Wiederholungen des IPPPPPLPG-Motives (Watanabe et al., 1997) enthält, für das Säuger Formin mDia1 und

dessen endogene Interaktion mit Profilin deutlich. Des weiteren scheinen diese Daten die Hypothese zu widerlegen, daß der autosomal vererbte, progressive Verlust des Gehörsinns auf eine gestörte Wechselwirkung von humanem *Diaphanous* und Profilin beruht (Lynch et al., 1997). Bei diesem Krankheitsbild ist das humane Dia-Protein in den Haarzellen des Innenohres C-terminal deletiert, enthält jedoch noch eine komplette FH1-Domäne. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß selbst stark verkürzte mDia-Fragmente immer noch mit Profilin über dessen Prolin-Bindungsstelle interagieren, sofern eine vollständige FH1-Domäne vorliegt. Dieses Ergebnis impliziert, daß diese kurzen Fragmente korrekt gefaltet sind. Die Ursache für den vollständigen Verlust des Gehörsinns scheint demnach andere Gründe als eine nicht vorhandene Interaktion mit Profilin zu haben. Möglicherweise ist die hohe Sensitivität der Stereocilien in den Haarsinneszellen des Innenohres im Hinblick auf eine korrekte und funktionelle Aktinorganisation für diesen Defekt verantwortlich.

Nachdem die Interaktion von mDia1 und Profilin über dessen Prolin-Bindungsstelle *in vivo* gezeigt werden konnte, schloß sich anschließend eine Charakterisierung verschiedener mDia1-Deletionsfragmente in der lebenden Zelle an.

2. Herstellung stabil transfizierter CHO-Zellen und Charakterisierung der Proteine im Zellsystem

Bei der Untersuchung von Proteinen im System Zelle kann es hilfreich sein, diese stabil zu transfizieren, um die Eigenschaften des Proteins besser analysieren zu können. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile Transfektanten mit EGFP, EGFP-mDia1 und EGFP- Δ 1mDia hergestellt. Vorausgegangen waren transiente Transfektionen von NIH3T3- und CHO-Zellen. Im Gegensatz zu den anderen Proteinen wies lediglich Δ 1mDia einen auffallenden Phänotyp nach transients Transfektion der Deletionsfragmente auf.

Zur Herstellung stabil exprimierender Klone wurden CHO-Zellen, Fibroblasten aus den Ovarien des chinesischen Hamsters, mit dem jeweiligen Expressionsvektor transfiziert. Die Selektion fand anschließend in Geneticin-haltigem Medium statt. Bei den stabil exprimierten Proteinen handelte es sich um mDia1, Δ 1mDia und Δ 7mDia, welche als Fusionsanteil das „green fluorescent protein“ (EGFP) besaßen. Der leere Vektor, der ausschließlich für diesen

Fusionsanteil codierte, diente in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente als Kontrolle. Auffallend bei der Herstellung der stabil exprimierenden Zellklone war die Tatsache, daß CHO-Zellen, welche die FH1-Domäne ($\Delta 7mDia$) und das N-terminal verkürzte $\Delta 3mDia$ -Protein überexprimierten, nach wenigen Tagen abstarben. Möglicherweise resultiert die Letalität nach Expression der beiden Polypeptide aus der Tatsache, daß diese Proteinabschnitte als dominant negative Inhibitoren wirken, einen Großteil des zellulären Profilins binden und dadurch dessen augenscheinlich für die Zelle lebenswichtige Funktionen unterbinden. Dazu zählt beispielsweise die Interaktion mit Aktin als Profilin-Aktin Komplex, sowie eine Wechselwirkung mit anderen prolinreichen Liganden des Profilins, zu denen z.B. das VASP gehört (Reinhard et al., 1995). CHO-Zellen, welche das wt-Protein, das $\Delta 1mDia$ -Deletionfragment oder das Kontrollplasmid EGFP stabil exprimierten, waren lebensfähig und zeigten keine Veränderungen in ihrem Proliferationsverhalten. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit und ihre Zellform entsprachen der von nicht-transfizierter Zellen. Von jeder Zell-Linie lagen mehrere Klone vor. Da sie sich phänotypisch nicht unterschieden, wurde im Verlauf der Arbeit nur mit einem, repräsentativem Klon pro stabil transfiziertem Fragment weitergearbeitet.

Die Anwesenheit der stabil exprimierten Proteine konnte mit Hilfe eines Immunblots verifiziert werden (Figur III.2.1).

3. Charakterisierung der stabil exprimierenden Zellen in Hinblick auf ihre Motilität

Die stabil transfizierten CHO-Zellen wurden dann in Hinsicht auf ihre zelluläre Motilität analysiert. Untersucht wurden drei Aspekte zellulärer Bewegung, zum einen die Geschwindigkeit mit der sich Zellen nach Aussaat ausbreiten, ihre lokomotorische Aktivität und abschließend die Ausbildung zelluläre Membrandynamiken, z.B. in Form von peripherem Ruffling.

Um den ersten Aspekt, das zelluläre Absetzverhalten, zu untersuchen, wurden die stabilen Transfektanten auf Deckgläschen ausgesät und in bestimmten Zeitabständen fixiert. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit wurde ermittelt, indem man die Zellen unterschiedlichen Kategorien zuordnete (Fig. III.2.2). Dabei zeigte sich, daß Zellen, welche das wt-Protein $mDia1$ exprimieren ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit, im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche lediglich den Fusionsanteil EGFP exprimieren, deutlich gesteigert haben. Nach 5 Stunden waren bei der Kontrolle nur etwa 35% aller Zellen flach ausgebreitet, während bei

Überexpression des mDia1-Proteins die Anzahl an ausgebreiteten bzw. nicht-ausgebreiteten Zellen fast gleich war. Dieser Effekt war in CHO-Zellen, die nur die Rho-Bindungsdomäne stabil exprimierten, noch drastischer ausgeprägt. Hier waren nach demselben Zeitraum fast schon 60% aller Zellen flach abgesetzt und nur etwa 40% zeigten noch eine kleine, rundliche Morphologie. Auch nach Charakterisierung der lokomotorischen Aktivität in einem „Wounding-Assay“ zeigte sich eine vergleichbare Tendenz bei den verwendeten Zelllinien. Die Fortbewegungsfähigkeit der das Δ 1mDia stabil exprimierenden Zellen war im Vergleich zum wt-Protein verlangsamt, wohingegen die Kontrollzellen in der Lage waren, die mit einer Pipettenspitze gezogene Wunde schon nach wenigen Stunden fast zu schließen (Fig. III.2.3). Bei der Charakterisierung des dritten Aspektes zellulärer Motilität (vgl. Seite 2-4), nämlich der Ausbildung peripherer Membrandynamiken, zeigte sich ein unerwartetes Ergebnis. CHO-Zellen, welche stabil das Deletionsfragment, das die Rho-Bindungsdomäne enthält, exprimierten, wiesen außerordentliche periphere Membrandynamiken auf, welche, morphologisch betrachtet, das Aussehen von Ruffles besaßen. Dieser Phänotyp war bei den anderen beiden Zell-Linien, die entweder mDia1 oder das Kontrollprotein EGFP überexprimierten, in diesem Ausmaß nicht vorhanden. Hier wiesen über 90% der untersuchten Zellen eine flach ausgebreitete Morphologie mit wenig Membrandynamik auf, während bei der dritten Zell-Linie weit über 80% aller Zellen eine ausgeprägte Membranaktivität zeigten, die die Form von Ruffles besaßen (Fig. III.2.4). Daß man in diesem Fall von echten Ruffles sprechen kann, zeigt die Tatsache, daß Proteine, die als Marker für diese Regionen der peripheren Zellmembran dienen, dort mit dem Δ 1mDia Eiweiß kolokalisieren (Fig. III.2.5). Zu diesen Marker-Proteinen gehören das Ezrin, welches zur ERM-Proteinfamilie gehört (Bretscher, 1991), F-Aktin und Profilin (Buss et al., 1991, Buss et al., 1992, Watanabe et al., 1997), sowie die kleinen GTPasen Rho und Rac (Takaishi et al., 1995, Watanabe et al., 1997, Ridley et al., 1992). Dieses Ergebnis war aber noch in einer weiteren Hinsicht bemerkenswert. Die Zellen zeigten diese Membrandynamik, die wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, echte Ruffling-Aktivität ist, da Marker-Proteine für diese Zellstrukturen dort kolokalisieren, ganz ohne Stimulation der Zellen von außen. Eine Kolokalisation von wt-mDia1, Profilin und RhoA in den Ruffles von MDCK-Zellen nach Stimulation mit TPA, war bereits bekannt (Watanabe et al., 1997), die hier verwendeten, stabil mit dem Δ 1mDia-Protein transfizierten CHO-Zellen, zeigten diese Aktivität jedoch ohne Zugabe von extrazellulären Faktoren.

Stimulation eines Ruffling-Phänotyps wurde bis jetzt als direkte Konsequenz einer Rac-Aktivierung angesehen, da die konstitutiv aktive Form dieser kleinen GTPase massives Ruffling in Fibroblasten induziert (Ridley et al., 1992). In den hier durchgeführten Experimenten wurde jedoch ein Fragment exprimiert, welches die Rho-Bindungsdomäne des mDia1-Proteins enthält und auf den ersten Blick keine Verbindung zu Rac zu haben scheint. Daß Rac sehr wohl an dem Ruffling-Phänotyp der CHO-Zellen beteiligt ist, zeigte die Tatsache, daß die Expression einer dominant negativen Form dieser GTPase, welche die zelluläre Aktivität dieses Proteins inhibierte, das spontane Ruffling-Verhalten der CHO-Zellen unterbunden hat (Fig. III.2.6). Bei stabil mit dem Δ 1mDia transfizierten CHO-Zellen, die zusätzlich noch N17Rac1 exprimierten, konnte die Ruffling-Aktivität fast hundertprozentig inhibiert werden (Fig. III.2.6). Etwas widersprüchlich sind dagegen Ergebnisse nach Inhibition der kleinen GTPase Rho durch Exoenzym C3, welches ein spezifischer Inhibitor dieses Proteins ist (Aktories et al., 1997). Supertransfektion mit Exoenzym C3 inhibiert fast vollständig Membran-Ruffling, vergleichbar mit Effekten nach Expression einer dominant negativen Form der GTPase Rac (vgl. Fig. III.2.6). Dieses Ergebnis deutet ebenfalls auf eine Beteiligung von Rho am Ruffling-Effekt hin, implizierend, daß neben Rac auch Rho für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Mikroinjiziert man jedoch C3-Exoenzym in unterschiedlichen Konzentrationen in stabil Δ 1mDia exprimierende CHO-Klone, so zeigen diese Zellen erst mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen eine Verminderung an Ruffling-Aktivität. Möglicherweise liegt nach Supertransfektion von Exoenzym C3 der Inhibitor bereits in so hohen Konzentrationen vor, daß eine gradueller Anstieg an inhibierten Zellen nicht beobachtet werden kann.

Die Schlußfolgerung, daß die kleine GTPase Rac am gezeigten Phänotyp beteiligt ist, erklärt auch die Ergebnisse aus den Versuchen zur Absetzgeschwindigkeit und dem „Wounding-Assay“. Wie bereits erwähnt, war das Absetzen der Zellen bei den CHO-Zellen, welche das wt-Protein exprimierten, schneller, ihre Motilität beim Schließen einer Wunde im Vergleich zu den Kontrollzellen aber verlangsamt. Diese Effekte waren in der dritten Zell-Linie, welche das Δ 1mDia-Protein exprimierte, noch ausgeprägter. Diese Zellen wiesen zusätzlich noch das massive, periphere Ruffling auf. Das schnellere Ausbreiten der Zellen ist möglicherweise auf eine Erhöhung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zurückzuführen. Diese könnte aus der Fähigkeit der Zellen resultieren, während des Ausbreitungsvorganges schneller kleine fokale Komplexe zu initiieren, die für eine korrekte Ausbreitung notwendig sind. Dieser Prozeß ist, wie von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, von der kleinen GTPase Rac abhängig (Machesky und Hall, 1996, Narumiya 1996, Ridley und Hall, 1992, Rottner et

al., 1999). Erst bei der Reifung der kleinen fokalen Komplexe zu großen fokalen Kontakten, kommt, Rho in das Spiel (Rottner et al. 1999). Aber auch das verlangsamte Schließen der Wunde im „Wounding-Assay“ läßt sich nach der Erkenntnis, daß die Expression von Δ ImDia die Rac-Aktivität beeinflusst, interpretieren. Bei lokomotorischen Zellen kommt es zur Ausbildung der sogenannten Führungslamelle am vorderen Zellpol. Mit Hilfe des Cytoskeletts, welches einer hohen Dynamik unterworfen ist, bildet die Zelle unter anderem Pseudopodien, Filopodien und Membran-Ruffles, bevor der restliche Zellkörper nach Ausbildung erster fokaler Komplexe nachgezogen wird. Klappen die Ruffles, welche keine Zell-Matrix-Kontakte ausgebildet haben, nach hinten um, kommt es zur Ausbildung des sogenannten „Rüschensaumes“ (vgl. Seite 2-4). Diese Art der Bewegung ist zumeist gerichtet und unterliegt einer Polarität, die durch die kleine GTPase Cdc42 beeinflusst wird. Bei dem hier geschilderten Versuch kam es zu einer Abnahme der lokomotorischen Aktivität bei CHO-Zell-Linien im Vergleich zu Kontrollzellen, welche stabil das wt-Protein mDia1 bzw. sein Deletionsfragment Δ ImDia exprimierten. Die Abnahme dieser Form der Motilität läßt vermuten, daß auch die dritte kleine GTPase, nämlich Cdc42, durch die Expression dieser Proteine beeinflusst wird. Cdc42 initiiert ebenso wie Rac die Ausbildung kleiner fokaler Komplexe (Rottner et al., 1999), weiterhin ist es für die Bildung von Filopodien und einer zellulären Polarität verantwortlich (Nobes und Hall, 1995, Nobes und Hall, 1999). Beide Strukturen sind für eine gerichtete, lokomotorische Bewegung essentiell. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltene CHO-Zell-Linie, die massives Ruffling aufweist, zeigt diese Membranstrukturen jedoch nicht nur im Bereich der Führungslamelle, sondern an der gesamten Zellperipherie (Fig. III.2.4). Dies läßt Rückschlüsse zu, daß nach Expression des die Rho-Bindungsdomäne enthaltenen Fragments die Zellpolarität, vermittelt durch Cdc42, gestört ist. Eine gerichtete lokomotorische Bewegung wäre dadurch nicht mehr gegeben, was eine Verlangsamung beim Schließen der Wunde in dem hier durchgeführten Experiment erklären würde.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse den Schluß zulassen, daß die Überexpression der Fragmentes, welches die Rho-Bindungsdomäne enthält sowie durch das wt-Protein, das Gleichgewicht zwischen den kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 in Hinblick auf ihre Aktivität massiv beeinflusst. Möglicherweise kommt es nach Expression dieser Proteine zu einer Bindung endogenem Rho-GTPs, welches dadurch aus dem fein abgestimmten Gleichgewicht der GTPasen herausgenommen wird. Daraus resultiert wiederum eine verminderte Cdc42-Aktivität,

sichtbar durch die fehlende Zellpolarität beim Schließen einer künstlich gezogenen Wunde, jedoch eine Steigerung der durch Rac vermittelten Effekte, was durch das massive, den ganzen Zellkörper betreffende Ruffling, deutlich wird.

Wie bereits erwähnt, ist die kleine GTPase Rho unter anderem für die Bildung von Streßfasern und diversen anderen Aktin-Strukturen verantwortlich (Ridley et al. 1992, Machesky und Hall, 1997). Bis jetzt ist es jedoch ungeklärt, wie die Beeinflussung der Rho-Effekte durch dieses Protein der Signaltransduktionskette vonstatten geht. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, daß mDia1 dabei eine wichtige Rolle spielt (Watanabe et al., 1999). So kommt es nach transienter Transfektion verschiedener mDia1-Deletionsfragmente zur Ausbildung von Streßfasern in HeLa-Zellen (Watanabe et al., 1999). Erklärt wird dieser Effekt durch das Aufbrechen einer intramolekularen Bindungsstelle im mDia1-Protein durch einige Deletionsfragmente, die N-terminal verkürzt waren. Dadurch kommt es, im Zusammenspiel mit der Protein-Kinase ROCK, zur Ausbildung unterschiedlicher Aktin-Strukturen (Watanabe et al., 1999). Auffallend war jedoch die Tatsache, daß es trotz Transfektion eines mDia1-Proteins, welches in etwa unserem Δ mDia-Deletionsfragment entsprach, nicht zur Ausbildung des Ruffling-Phänotypes kam. Dies scheint in einem scheinbaren Widerspruch zu den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen zu stehen, wo es nach transienter und stabiler Transfektion zur massiven Ausbildung peripherer Membranaktivitäten kam. Diese Diskrepanz läßt sich jedoch auflösen. Obwohl murines (mDia1) und humanes mDia1-Protein (hDia1) insgesamt eine Homologie von über 90% aufweisen, zeigt der C-Terminus der beiden Proteine eine Reihe von Aminosäureaustauschen. Unterwirft man beide Proteine einem Sequenzvergleich (Sequenzvergleich mit Hilfe des Programms LasergeneTM, DNASTAR Inc.), so fällt auf, daß die Unterschiede besonders im C-Terminus geclustert vorliegen, während der N-terminale Bereich eine Homologie von über 90% aufweist. Unterstützt wird die Hypothese, daß die erhaltenen mDia1-Effekte speziesabhängig sind, von der Tatsache, daß nach Transfektion von HeLa und CHO-Zellen mit dem Δ mDia-Fragment, es lediglich in CHO-Zellen zur Co-Immunpräzipitation von endogenem mDia1 kam, nicht aber in der humanen Zell-Linie. Auffallend war aber ebenfalls die Tatsache, daß endogenes Rho in keiner der beiden Zellarten präzipitiert werden konnte. Dies kann aber an dem hier gewählten experimentellen Ansatz der Co-Immunpräzipitation liegen, mit dem eine Interaktion zwischen kleinen GTPasen und anderen Proteinen gar nicht oder nur schwer nachweisbar ist (persönliche Mitteilung von S. Narumiya).

Der Ruffling-Effekt ist demnach nicht nur speziesspezifisch, er ist ebenfalls ausgeprägter nach Transfektion des deletierten $\Delta 1mDia$ -Fragmentes, welches zwar endogenes mDia1 in CHO-Zellen präzipitiert, scheinbar aber nicht Rho.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.

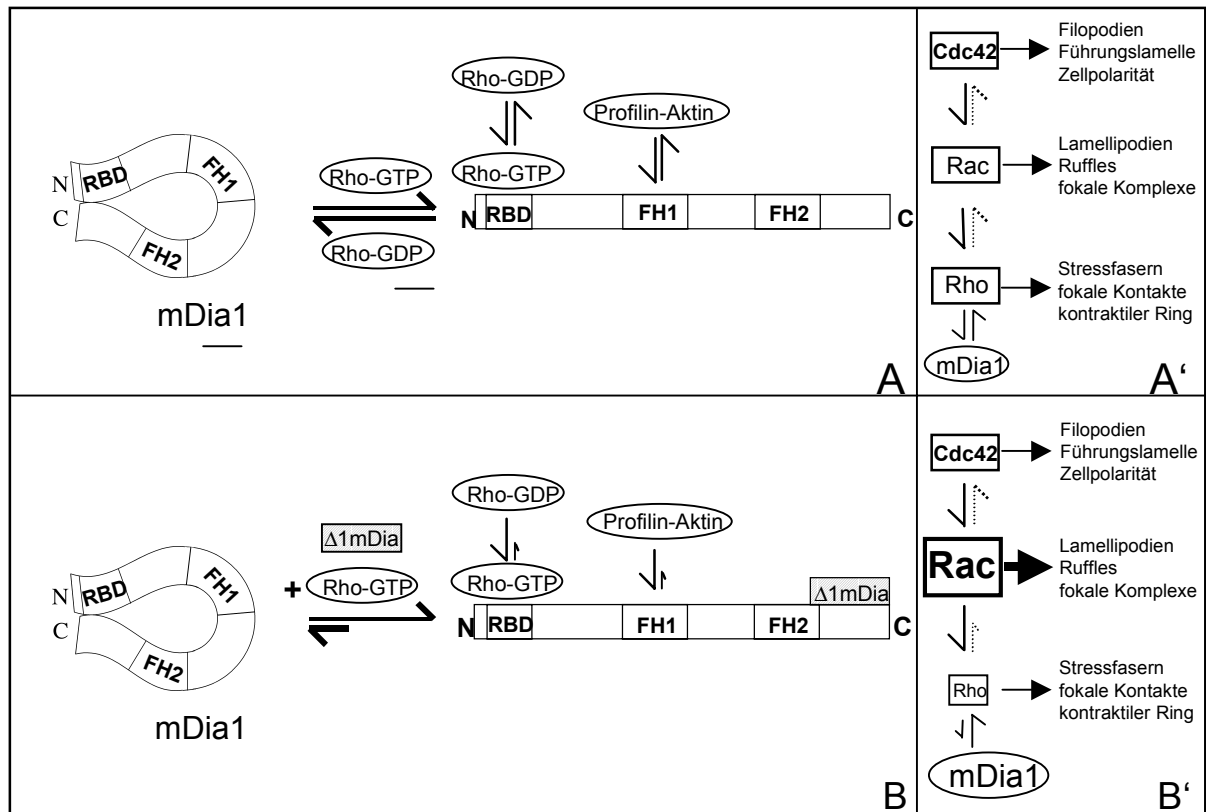


Abb. IV.1.: Modellvorstellung zum Zusammenspiel von mDia1, Rho und Profilin-Aktin, und der zellulären Kommunikation der kleinen GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA im Hinblick auf aktin-vermittelte Motilität.

(A, A'): „Normale“ Situation in nicht-transfizierten Zellen. Das Formin mDia1 liegt entweder in einer geschlossenen, inaktiven oder in einer geöffneten, aktiven Konformation vor. Das Gleichgewicht dieser beiden Zustände wird durch den zellulären Spiegel an GTP-Rho beeinflusst, das durch seine Bindung an die N-terminale Rho-Bindungsdomäne das Formin öffnet, indem es die intramolekulare Interaktion von N- und C-Terminus zerstört. Aktives mDia1 ist dann möglicherweise in der Lage über die FH1-Domäne einen Profilin-Aktin-Proteinkomplex an die Plasmamembran zu rekrutieren, wo sich dann dynamische Membranstrukturen bilden (A). Die kleinen GTPasen regulieren sich gegenseitig, entweder positiv oder negativ, was wiederum Auswirkungen auf die bevorzugte Bildung der jeweiligen dynamischen Aktin-Strukturen hat (A').

(B, B'): Situation in stabil $\Delta 1mDia$ exprimierenden Zellen. Überexpression der Rho-Bindungsdomäne führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes endogenen mDia1 hin zur aktiven Konformation, da es durch Bindung an den C-Terminus dieses öffnet. Eine Verschiebung hin zu mehr aktivem Protein führt zu einer vermehrten Bindung zellulären GTP-Rho's, was dadurch aus dem endogenem Gleichgewicht, das zwischen den GTPasen herrscht, herausgenommen wird. Dies resultiert möglicherweise zu einer erhöhten Bindung von Profilin-Aktin an die FH1-Domäne (B). Diese Ereignisse verschieben dann das Gleichgewicht, das zwischen den GTPasen herrscht, zu Gunsten von Rac. Dessen Effekte kommen dadurch stärker zum Vorschein (B').

Die hier gewonnenen Daten weisen darauf hin, daß in einem homologen System mDia1 durch das überexprimierte Δ 1mDia-Fragment geöffnet und damit aktiviert wird. Dieses aktive Protein kann dann möglicherweise wiederum endogenes Rho-GTP binden, welches ebenfalls in der Lage ist endogenes mDia1 zu aktivieren. Eine Interaktion mit Rho-GTP nicht aber mit Rho-GDP konnte bereits nachgewiesen werden (Watanabe et al., 1997). Durch Bindung der aktivierten Form dieser kleinen GTPase an die Rho-Bindungsstelle des endogenen mDia1-Proteins kommt es dort zu dessen Arretierung. Möglicherweise kommt es gleichzeitig zur Bindung von Profilin an die prolinreiche FH1-Domäne, vielleicht sogar als Profilin-Aktin-Komplex. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Kolo-kalisation von Δ 1mDia, RhoA und Profilin in den Ruffles (vgl. Fig. III.2.5). Dort käme es dann zur Initiation der Aktin-Polymerisation, dessen hoch dynamische Filamente für die Ausbildung dieser Strukturen verantwortlich sind. Das Gleichgewicht zwischen den kleinen GTPasen Cdc42, Rac, und Rho verschiebt sich dadurch. Da aktives Rho durch seine Bindung an endogenes mDia1, welches wiederum durch das Δ 1mDia-Protein verstärkt aktiviert wird, vermindert ist, überwiegen Rac-vermittelte Effekte, die zu einem massiven Ruffeln der Zelle als auffallendstes Merkmal führen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf ein intensives Zusammenspiel der kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho in der Zelle hinweisen. Im Hinblick auf ihre Rolle in der Aktin-abhängigen Motilität scheint die bis jetzt angenommen strikte Hierarchie zwischen diesen Proteinen die reale Situation nicht ausreichen erklären zu können (Zigmond, 1996). Hier wird davon ausgegangen, daß Cdc42 Rac aktiviert, welches wiederum Rho beeinflusst (Zigmond, 1996). Die gewonnenen Daten weisen ebenfalls aber auch auf eine Umkehrung, entweder direkt oder indirekt, der Signaltransduktions-Kaskade hin, wo Rho, Rac- und Cdc42-Aktivitäten beeinflusst. Ein Modell dafür wird in Abb. IV.1. gezeigt. Links wird der vermutete Zusammenhang zwischen GTP-Rho, mDia1 und Profilin, als Komplex mit Aktin, gezeigt, während rechts die Auswirkung auf die kleinen GTPasen und deren zelluläre Effekte dargestellt sind. In einer nicht-transfizierten CHO-Zelle wird das Formin mDia1 durch GTP-Rho aktiviert, indem die GTPase dessen intramolekulare Bindungsstelle aufbricht. Das Gleichgewicht zwischen der inaktiven, geschlossenen Form des mDia1-Proteins und einer geöffneten aktiven, kann also durch GTP-Rho moduliert werden, welches mit der N-terminal gelegenen Rho-Bindungsstelle interagiert und dadurch die Wechselwirkung von N- und C-Terminus stört. Das geöffnete, aktive Protein ist dann in der Lage Profilin, möglicherweise als Komplex mit Aktin, über seine prolinreiche FH1-Domäne

unterhalb der Plasmamembran zu rekrutieren. Dort kommt es dann zur Bildung dynamischer Aktin-Strukturen. Welche Aktin-Struktur gebildet wird, hängt wiederum vom Zusammenspiel der drei kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho ab. Exprimiert man jedoch das $\Delta 1mDia$ -Deletionsfragment in CHO über, verschiebt man das zelluläre Gleichgewicht des endogenen wt-Proteins hin zu dessen geöffneter, aktiver Form, da daß deletierte Protein die Interaktion von N- und C-Terminus aufbricht, indem es selbst mit dem C-Terminus wechselwirkt. $\Delta 1mDia$ wirkt also in Kooperation mit GTP-Rho, indem es zelluläres mDia1 zur aktiven Form öffnet. Unterschiedlich sind nur die Bindungsstellen. GTP-Rho bindet an die Rho-Bindungsdomäne, während $\Delta 1mDia$ mit dem C-Terminus wechselwirkt. Eine Interaktion von N-Terminus und C-Terminus, wobei dessen letzte 73 Aminosäuren notwendig sind, konnte bereits an anderer Stelle gezeigt werden (Watanabe et al., 1999). Eine Verschiebung von mDia1 hin zu seiner aktiven Form führt dann wiederum zu einer gesteigerten Bindung cytoplasmatischen Rho-GTPs an das endogene, aktive Protein. Dadurch nimmt man die kleine GTPase aus ihrem normalen Gleichgewicht, welches zwischen der aktiven und einer GDP-gebundenen, inaktiven Form wechselt, heraus. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung von Profilin, als Komplex mit Aktin, an die FH1-Domäne des endogenen mDia1-Proteins. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den GTPasen Cdc42, Rac und Rho. Indem der Pool an aktivem GTP-Rho vermindert wird, kommt es zu einer Verstärkung von Effekten, die durch Rac beeinflusst werden, in diesem Fall hauptsächlich massives, zelluläres Ruffling. Cdc42-Effekte scheinen ebenfalls vermindert zu sein, da $\Delta 1mDia$ exprimierende Zellen scheinbar keine Polarität mehr ausbilden können, ein Effekt, der durch Cdc42 beeinflusst wird.

4. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Charakterisierung der funktionellen Domänen des mDia1-Proteins liefern einen Beitrag zur Aufklärung der grundlegenden Eigenschaften der Formine an der Schnittstelle zwischen Signaltransduktion und Aktin-Cytoskelett, vor allem in Hinblick auf ihre Interaktion mit Profilin und der kleinen GTPase Rho in Zellen.

Mit den stabil exprimierenden CHO-Zell-Linien steht jetzt ein Werkzeug zur Untersuchung zur Rolle des mDia1-Proteins und seiner funktionellen Domänen, besonders im Zusammenhang mit der Signaltransduktionskaskade, zur Verfügung. Entsprechende Experimente, besonders die intramolekulare Bindungsstelle betreffend, sind geplant, wobei gemäß der Funktion des mDia1-Proteins das Hauptaugenmerk auf die Charakterisierung der Dynamik des Aktin-Cytoskeletts liegen wird. Dazu werden weitere Deletions-Fragmente des wt-Formins hergestellt, um in *in vitro*- und in *in vivo*-Experimenten im Hinblick auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen N- und C-Terminus näher charakterisiert zu werden.

Desweiteren muß noch die genaue Funktion der kleinen GTPase Rho im Zusammenhang mit dem Ruffling-Effekt geklärt werden. Die Verwendung einer dominant negativen Form dieses Proteins könnte zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen.

V. Literatur

Aktories, K. (1997) Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol*, **5**, 282-288.

Alvarez-Martinez, M.T., Mani, J.C., Porte, F., Faivre-Sarrailh, C., Liautard, J.P. and Sri Widada, J. (1996) Characterization of the interaction between annexin I and profilin. *Eur J Biochem*, **238**, 777-784.

Alvarez-Martinez, M.T., Porte, F., Liautard, J.P. and Sri Widada, J. (1997) Effects of profilin-annexin I association on some properties of both profilin and annexin I: modification of the inhibitory activity of profilin on actin polymerization and inhibition of the self-association of annexin I and its interactions with liposomes. *Biochim Biophys Acta*, **1339**, 331-340.

Aspenstrom, P. (1999a) Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 95-102.

Aspenstrom, P. (1999b) The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, **246**, 20-25.

Badolato, R., Sozzani, S., Malacarne, F., Bresciani, S., Fiorini, M., Borsatti, A., Albertini, A., Mantovani, A., Ugazio, A.G. and Notarangelo, L.D. (1998) Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol*, **161**, 1026-1033.

Balasubramanian, M.K., Hirani, B.R., Burke, J.D. and Gould, K.L. (1994) The *Schizosaccharomyces pombe cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol*, **125**, 1289-1301.

Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**, 920-924.

Binette, F., Benard, M., Laroche, A., Pierron, G., Lemieux, G. and Pallotta, D. (1990) Cell-specific expression of a profilin gene family. *DNA Cell Biol*, **9**, 323-334.

Bione, S., Sala, C., Manzini, C., Arrigo, G., Zuffardi, O., Banfi, S., Borsani, G., Jonveaux, P., Philippe, C., Zuccotti, M., Ballabio, A. and Toniolo, D. (1998) A human homologue of the *Drosophila melanogaster diaphanous* gene is disrupted in a patient with premature ovarian

failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet*, **62**, 533-541.

Blasco, R., Cole, N.B. and Moss, B. (1991) Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene. *J Virol*, **65**, 4598-4608.

Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643-654.

Bretscher, A. (1991) Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, **7**, 337-374.

Bretscher, A., Reczek, D. and Berryman, M. (1997) Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci*, **110**, 3011-3018.

Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S. and Jockusch, B.M. (1992) Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton*, **22**, 51-61.

Buss, F., Temm-Grove, C. and Jockusch, B.M. (1991) Cortical microfilament proteins and the dynamics of the plasma membrane. *Acta Histochem Suppl*, **41**, 291-301.

Castrillon, D.H. and Wasserman, S.A. (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains. *Development*, **120**, 3367-3377.

Chan, D.C., Bedford, M.T. and Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *Embo J*, **15**, 1045-1054.

Chan, D.C. and Leder, P. (1996) Genetic evidence that formins function within the nucleus. *J Biol Chem*, **271**, 23472-23477.

Chan, D.C., Wynshaw-Boris, A. and Leder, P. (1995) Formin isoforms are differentially expressed in the mouse embryo and. *Development*, **121**, 3151-3162.

Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997) cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol*, **137**, 169-182.

- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K. (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, **133**, 1403-1415.
- Cicchetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G. and Baltimore, D. (1992) Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science*, **257**, 803-806.
- Emmons, S., Phan, H., Calley, J., Chen, W., James, B. and Manseau, L. (1995) Cappuccino, a Drosophila maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev*, **9**, 2482-2494.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M. and Boone, C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, **276**, 118-122.
- Fields, S. and Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*, **10**, 286-292.
- Frazier, J.A. and Field, C.M. (1997) Actin cytoskeleton: are FH proteins local organizers? *Curr Biol*, **7**, R414-417.
- Gieseemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M. and Jockusch, H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem*, **274**, 37908-37914.
- Haarer, B.K., Lillie, S.H., Adams, A.E., Magdolen, V., Bandlow, W. and Brown, S.S. (1990a) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of. *J Cell Biol*, **110**, 105-114.
- Haarer, B.K., Lillie, S.H., Adams, A.E., Magdolen, V., Bandlow, W. and Brown, S.S. (1990b) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol*, **110**, 105-114.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.

- Harris, S.D., Hamer, L., Sharpless, K.E. and Hamer, J.E. (1997) The *Aspergillus nidulans* *sepA* gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *Embo J*, **16**, 3474-3483.
- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Karakesisoglou, J. and Schleicher, M. (1994) Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell*, **79**, 303-314.
- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Rieger, D., Lottspeich, F. and Schleicher, M. (1991) Dictyostelium discoideum contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci*, **100**, 481-489.
- Honore, B., Madsen, P., Andersen, A.H. and Leffers, H. (1993) Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett*, **330**, 151-155.
- Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M. and Rudiger, M. (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol*, **8**, 479-488.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. and Takai, Y. (1997) Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **16**, 2745-2755.
- Kaiser, D.A., Sato, M., Ebert, R.F. and Pollard, T.D. (1986) Purification and characterization of two isoforms of *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, **102**, 221-226.
- Kohno, H., Tanaka, K., Mino, A., Umikawa, M., Imamura, H., Fujiwara, T., Fujita, Y., Hotta, K., Qadota, H., Watanabe, T., Ohya, Y. and Takai, Y. (1996) Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p. *Embo J*, **15**, 6060-6068.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S. and Lim, L. (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol*, **17**, 1201-1211.
- Kwiatkowski, D.J. (1988) Predominant induction of gelsolin and actin-binding protein during myeloid differentiation. *J Biol Chem*, **263**, 13857-13862.

Kwiatkowski, D.J., Aklog, L., Ledbetter, D.H. and Morton, C.C. (1990) Identification of the functional profilin gene, its localization to chromosome subband 17p13.3, and demonstration of its deletion in some patients with Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet*, **46**, 559-567.

Kwiatkowski, D.J. and Bruns, G.A. (1988) Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis. *J Biol Chem*, **263**, 5910-5915.

Lambrechts, A., van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1995) Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L- proline) and inositolphospholipid binding. *Eur J Biochem*, **230**, 281-286.

Lauffenburger, D.A. (1996) Cell motility. Making connections count [news; comment]. *Nature*, **383**, 390-391.

Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-369.

Lim, W.A., Richards, F.M. and Fox, R.O. (1994) Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains [see comments] [published erratum appears in Nature 1995 Mar 2;374(6517):94]. *Nature*, **372**, 375-379.

Lu, P.J., Shieh, W.R., Rhee, S.G., Yin, H.L. and Chen, C.S. (1996) Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry*, **35**, 14027-14034.

Lynch, E.D., Lee, M.K., Morrow, J.E., Welcsh, P.L., Leon, P.E. and King, M.C. (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous [see comments]. *Science*, **278**, 1315-1318.

Ma, J. and Ptashne, M. (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, **51**, 113-119.

Machesky, L.M. (1998) Cytokinesis: IQGAPs find a function. *Curr Biol*, **8**, R202-205.

Machesky, L.M., Cole, N.B., Moss, B. and Pollard, T.D. (1994) Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry*, **33**, 10815-10824.

- Magdolen, V., Oechsner, U., Muller, G. and Bandlow, W. (1988) The intron-containing gene for yeast profilin (PFY) encodes a vital function. *Mol Cell Biol*, **8**, 5108-5115.
- Manseau, L., Calley, J. and Phan, H. (1996) Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development*, **122**, 2109-2116.
- Marhoul, J.F. and Adams, T.H. (1995) Identification of developmental regulatory genes in *Aspergillus*. *Genetics*, **139**, 537-547.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. and Takenawa, T. (1998a) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin. *Nature*, **391**, 93-96.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998b) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization. *Embo J*, **17**, 6932-6941.
- Narumiya, S. (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)*, **120**, 215-228.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995a) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*, **23**, 456-459.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995b) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, **144**, 1235-1244.
- Osborn, M. and Weber, K. (1977) The detergent-resistant cytoskeleton of tissue culture cells includes the nucleus and the microfilament bundles. *Exp Cell Res*, **106**, 339-349.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. and Hagan, I.M. (1998) FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1. *J Cell Biol*, **141**, 1217-1228.
- Petersen, J., Weilguny, D., Egel, R. and Nielsen, O. (1995) Characterization of fus1 of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol Cell Biol*, **15**, 3697-3707.

Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J*, **14**, 1583-1589.

Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. and Baltimore, D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259**, 1157-1161.

Ridley, A.J. (1995) Microinjection of Rho and Rac into quiescent Swiss 3T3 cells. *Methods Enzymol*, **256**, 313-320.

Ridley, A.J. (1996) Rho: theme and variations. *Curr Biol*, **6**, 1256-1264.

Ridley, A.J. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-399.

Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.

Rottner, K., Hall, A. and Small, J.V. (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, **9**, 640-648.

Schluter, K., Schleicher, M. and Jockusch, B.M. (1998) Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J Cell Sci*, **111**, 3261-3273.

Sohn, R.H. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays*, **16**, 465-472.

Staiger, C.J., Goodbody, K.C., Hussey, P.J., Valenta, R., Drobak, B.K. and Lloyd, C.W. (1993) The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J*, **4**, 631-641.

Stasia, M.J., Jouan, A., Bourmeyster, N., Boquet, P. and Vignais, P.V. (1991) ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum* and effect on the cell motility. *Biochem Biophys Res Commun*, **180**, 615-622.

- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Sudol, M. (1996) The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem Sci*, **21**, 161-163.
- Sun, H.Q., Kwiatkowska, K. and Yin, H.L. (1995) Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 102-110.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeichi, M. and Takai, Y. (1994) Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene*, **9**, 273-279.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. and Takai, Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*, **139**, 1047-1059.
- Tominaga, T., Sahai, E., Chardin, P., McCormick, F., Courtneidge, S.A. and Alberts, A.S. (2000) Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase. *Mol Cell*, **5**, 13-25.
- Trump, A., Blundell, P.A., de la Pompa, J.L. and Zeller, R. (1992) The chicken limb deformity gene encodes nuclear proteins expressed in specific cell types during morphogenesis. *Genes Dev*, **6**, 14-28.
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D. and et al. (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med*, **175**, 377-385.
- Verheyen, E.M. and Cooley, L. (1994) Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. *Development*, **120**, 717-728.
- Wasserman, S. (1998) FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol*, **8**, 111-115.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. and Narumiya, S. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, **1**, 136-143.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of

Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J*, **16**, 3044-3056.

Weiss, E.E., Kroemker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M. and Rudiger, M. (1998) Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol*, **141**, 755-764.

Westendorf, J.J., Mernaugh, R. and Hiebert, S.W. (1999) Identification and characterization of a protein containing formin homology (FH1/FH2) domains. *Gene*, **232**, 173-182.

Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C. and Mann, M. (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *Embo J*, **17**, 967-976.

Woychik, R.P., Maas, R.L., Zeller, R., Vogt, T.F. and Leder, P. (1990) 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature*, **346**, 850-853.

Woychik, R.P., Stewart, T.A., Davis, L.G., D'Eustachio, P. and Leder, P. (1985) An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature*, **318**, 36-40.

Wu, H., Reynolds, A.B., Kanner, S.B., Vines, R.R. and Parsons, J.T. (1991) Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol*, **11**, 5113-5124.

Zahner, J.E., Harkins, H.A. and Pringle, J.R. (1996) Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 1857-1870.

Zhan, X., Plourde, C., Hu, X., Friesel, R. and Maciag, T. (1994) Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src. *J Biol Chem*, **269**, 20221-20224.

Zicha, D., Allen, W.E., Brickell, P.M., Kinnon, C., Dunn, G.A., Jones, G.E. and Thrasher, A.J. (1998) Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol*, **101**, 659-665.

Zigmond, S.H. (1996) Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 66-73.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. B.M. Jockusch für die Betreuung meiner Arbeit und ihr reges Interesse, das sich in zahlreichen Diskussionen und Anregungen ausdrückte.

Herrn Prof. Dr. J. Wehland danke ich für die freundliche Bereitschaft, meine Arbeit als Zweitgutachter zu referieren.

Bei Herrn Dr. Rothkegel bedanke ich mich für die fachliche und persönliche Unterstützung und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellbiologie für die gute Atmosphäre und die vielen Hilfen, wobei ich insbesondere Frau Dr. Kathrin Schlüter für ihre Unterstützung und Geduld danke.

Bei meinen Eltern, besonders bei meinem Opa Andreas bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die unermüdliche, oft finanzielle Unterstützung.

Danke Andreas, für deine unermüdliche Unterstützung